



TITLE:

ベンゼンによる染色体異常誘発リ
スク評価手法の構築(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

中山, 亜紀

CITATION:

中山, 亜紀. ベンゼンによる染色体異常誘発リスク評価手法の構築. 京都大学, 2001, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183404>

RIGHT:

新制
工
1203

ベンゼンによる染色体異常誘発リスク評価手法の構築

中山亜紀

ベンゼンによる染色体異常誘発リスク評価手法の構築

2001年1月

中山 亜紀

目 次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 従来の発がんリスク評価と発がんメカニズム	1
1.3 ベンゼン	4
1.4 本研究の目的と論文の構成	5
参考文献	6
第2章 シャトルベクターpNY200の構築	7
2.1 はじめに	7
2.2 シャトルベクターpNY200の構築	9
2.2.1 試薬および細胞	9
2.2.2 シャトルベクターpNY200の構築	9
2.3 pNY200の複製能および変異原検出能の確認	11
2.3.1 確認手順	11
2.3.2 突然変異頻度の決定	11
2.3.3 実験結果および考察	12
2.4 まとめ	13
参考文献	13
第3章 マウスHL18細胞を用いたパラベンゾキノンによる突然変異の解析	14
3.1 はじめに	14
3.2 シャトルベクターを用いた突然変異の解析	14
3.2.1 試薬および細胞	14
3.2.2 <i>p</i> -BQによるシャトルベクターpNY200の処理と細胞への導入	15
3.2.3 変異 <i>supF</i> 遺伝子の塩基配列の決定	16
3.2.4 ³² P-ポストラベル法によるDNA付加体の検出	16
3.2.5 ストップアッセイによるDNA付加体の形成サイトの決定	18
3.3 実験結果	19
3.3.1 プラスミド回収率と突然変異頻度	19
3.3.2 突然変異の内訳	21
3.3.3 突然変異スペクトル	23
3.3.4 付加体の検出	23
3.3.5 <i>p</i> -BQ付加体形成サイト	24
3.4 考察	25
3.5 まとめ	26
参考文献	27
第4章 ヒトWI38-VA13細胞を用いたパラベンゾキノン誘発突然変異の解析	28
4.1 はじめに	28
4.2 実験方法	28
4.2.1 試薬および細胞	28

4.2.2 実験手順	29
4.3 実験結果	29
4.3.1 プラスミド回収率と突然変異頻度	29
4.3.2 突然変異の内訳	30
4.3.3 突然変異スペクトル	33
4.4 考察	34
4.5 マウスHL18細胞との比較考察	36
4.6 まとめ	38
参考文献	39
 第5章 ベンゼン代謝生成物ムコンアルデヒドによる突然変異の解析	 41
5.1 はじめに	41
5.2 シャトルベクターを用いた突然変異の解析	42
5.2.1 試薬および細胞	42
5.2.2 実験手順	42
5.3 実験結果	42
5.3.1 プラスミド回収率と突然変異頻度	42
5.3.2 突然変異の内訳	43
5.3.3 突然変異スペクトル	45
5.4 考察	46
5.5 まとめ	48
参考文献	49
 第6章 ベンゼン代謝生成物ハイドロキノンによる突然変異の解析	 50
6.1 はじめに	50
6.2 シャトルベクターを用いた突然変異の解析	51
6.2.1 試薬および細胞	51
6.2.2 実験手順	51
6.3 実験結果	52
6.3.1 DNA 鎖の切断	52
6.3.2 プラスミド回収率と突然変異頻度	53
6.3.3 突然変異の内訳	54
6.3.4 突然変異スペクトル	57
6.4 考察	58
6.5 まとめ	60
参考文献	61
 第7章 ベンゼン代謝生成物による突然変異の寄与	 63
7.1 はじめに	63
7.2 パラベンゾキノン	63
7.3 ムコンアルデヒド	64
7.4 ハイドロキノン	64
7.5 突然変異誘発能およびスペクトルの比較	65

7.6 まとめ	70
参考文献	70
第8章 ベンゼンによる白血病関連染色体異常誘発確率の推定	72
8.1 はじめに	72
8.2 染色体異常	76
8.2.1 DNA 鎖切断と染色体異常	76
8.2.2 染色体各部の名称と記号	77
8.2.3 染色体数の異常に関する表記	77
8.3 白血病に特異的な染色体異常	78
8.3.1 CMLとPh ⁺ 染色体	78
8.3.2 AMLにおける染色体異常出現頻度	78
8.3.3 AMLと8;21転座	78
8.3.4 AMLと15;17転座	79
8.4 ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座誘発確率の評価	79
8.4.1 ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座誘発確率評価の手順	79
8.4.2 ベンゼン曝露によるHQの生成量	81
8.4.3 HQによるDSB	81
8.4.4 SBE モデルによるmisrejoiningの推定	83
8.4.5 白血病に特異的な染色体異常の発生確率	86
8.5 ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座の誘発率	88
8.6 まとめ	91
参考文献	92
第9章 結論	94
謝辞	
発表論文リスト	

第1章 序論

1.1 はじめに

日本は、世界でも有数の恵まれた国である。今日の日本人は、多くのものを手に入れている。高度の教育水準。整備されたインフラと衛生的な環境。高い経済レベル。高度な医療技術。平均寿命約80歳の最長寿国でさえもある。

1950年代後半から1970年代中頃、日本が高度経済成長期にあった頃は、我が国は公害という大きな問題を抱えていた。当時、熊本県の水俣病、富山県のイタイイタイ病、四日市喘息などの劇症を呈する公害病に、多くの人が健康や命を失っている。1970年には、いわゆる「公害国会」が開かれ、大気汚染防止法や水質汚濁防止法などの法律が制定、国レベルで公害対策に関する法体系の整備が行われた。日本の環境政策は、これまで相応の成果を挙げてきたのではないと思う。以前のように環境汚染物質が局所的に高濃度で存在することは、少なくなっている。今日の環境汚染は、多くの場合、微量な汚染が問題である。汚染物質の存在量が極微量であるために、一体どのようなことが起きるのか、どの程度影響があるのか、私たちが理解することは難しい。

今日、「環境問題」には多くの関心とエネルギーが向けられている。しかし、解決すべき問題は、山積している。環境汚染物質による日本人の健康影響は、優先的に取り上げるべき問題なのかどうか。実は、私はそれさえもよく分かっていない。

限られた時間内に、限られた資金と労力で、人々（将来世代を含めて）の福祉の改善を図ろうとしたときに、優先されるべき問題はなにか？

環境汚染物質対策については健康リスクという指標が、優先順位を決定する判断基準として用いられようとしている。しかし、これまでの健康リスク評価は、十分正確なものだっただろうか？動物実験の外挿は本当に有効なのか？疫学調査からリスクが推定されるのは、不幸にも事故が起きたときだけではないか？新たな汚染物質が問題となったときに、これまでの方法が、十分に対応できるのか？どんな物質に対しても、より正確で普遍的な健康リスク評価体系を確立することは可能であろうか。生物学的なメカニズムを詳細に検討することで、この問題は解決できるのではないだろうか。

今日、科学の発展により、私たちは多くの重要な情報を共有している。多くの人々から同意を得るためには、環境汚染物質による健康リスクの評価方法は共通の知識や情報が基盤であらねばならない。本研究は、生物学という基盤を持った新しい健康リスク評価体系の枠組みづくりを最終的な目標としている。

1.2 従来の発がんリスク評価と発がんメカニズム

ヒトの発がん性の予測には2つの重要な情報源、すなわち動物を用いた長期投与試験とヒト集団における疫学的調査が用いられる。定量的な発がんリスク評価は、ほとんどの場合動物試験の結果をヒトへ

外挿することで行われる。発がん物質の用量をヒトに外挿する場合は、一般に体重比または体表面積比が用いられている。しかし、どちらを用いるかでリスクの程度は大きく異なる。たとえば、ラットあるいはマウスの実験結果に基づいたリスクアセスメントでは、体重あたりの投与量を基準としてヒトでのリスクを計算した場合に比べ、体表面積を基準として計算したリスクは、ラットで約6倍、マウスで約14倍高い値となる。

EPA（米国環境保護庁）は、1986年の発ガン性リスク評価のガイドライン[1]において、動物実験での投与量をヒトに外挿する際には、体表面積（体重の $2/3$ 乗に比例）を考慮することが適当であることを示している。これは投与量を体重当たりではなく、体表面積あたりで示すことにより、動物とヒトで毒性発現が同等になるとの実験結果に基づいている[2]。しかし、その後、体表面積比に相当する体重の $2/3$ 乗ではなく、体重の $3/4$ 乗を用いる方が適切であると提案している[3]。

従来のリスクアセスメントは、体内という見えないところで何か重要なことが起きている「ブラックボックス」的な動物実験に大いに依存している。しかし、生物学が飛躍的に進歩しつづける現在、動物モデルは、もはや「ブラックボックス」ではなくなった。現在では、発がん（あるいは毒性発現）のメカニズムさえも解明されつつある。従来のリスクアセスメントが持っていた不確実さが、その「ブラックボックス」的動物モデルにあるのだとすれば、これからのリスク評価には生物というシステムに関する情報を組み込む必要があるだろう。発がんリスクを評価するにあたっては、これまでに解明されてきた発がんのメカニズムに関する情報を役立てるべきである。また、実験動物という「ブラックボックス」とヒトという「ブラックボックス」の質的な差違、すなわち生物間種差も考慮せねばならない。

化学物質による発がんのメカニズムについて数多くの研究がなされてきた結果、その大筋には科学的合意が認められている。がんは、イニシエーション、プロモーション、プログレッションなどのいくつかの段階を経て発生すると考えられている。イニシエーションとは、細胞内の遺伝子が突然変異を起こすことで起きる。イニシエーションを受けた細胞は、前腫瘍細胞となり、プロモーション（促進）、プログレッション（進展）と呼ばれる過程を経て、悪性の腫瘍細胞となる（Fig. 1-1 参照）。

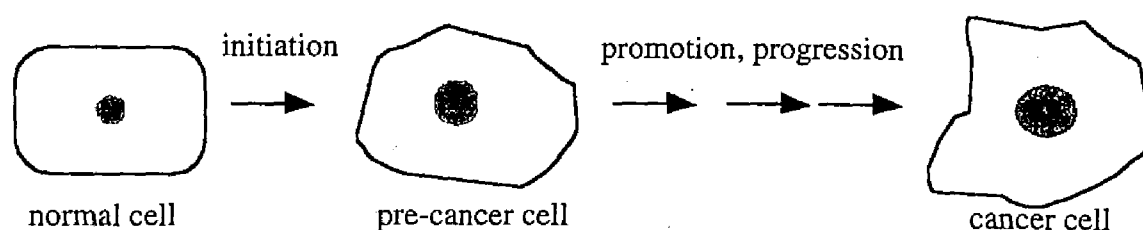


Fig. 1-1 多段階発がんモデルの概要

発がん物質の多くは、発がんのイニシエーターである。発がん物質が、生体の細胞核に到達し、遺伝

子であるDNAと化学的に反応し、DNA鎖を切断したり、DNAの塩基に余計な付加体を作るなどして損傷を与える。生物には一般に損傷を修復する機能が備わっているが、適切に修復されない場合、遺伝子の突然変異として固定される（Fig. 1-2 参照）。

このような突然変異を誘発する物質は変異原物質と呼ばれ、多くの変異原物質は発がん性を示している。

化学物質による突然変異誘発のメカニズムは、多くの研究者によって非常に詳細に研究されている。化学物質による発がんリスク評価に、その物質が誘発する突然変異のメカニズムに関する情報を組み込むことで、より正確なリスク評価手法を確立することができるのではないだろうか。

これまで、様々な化学物質の、リスクアセスメントが行われてきた。中でもベンゼンは、疫学調査、動物実験による発がん試験、バクテリアや培養細胞を使った試験管内試験と種々の知見が蓄積されている。本研究では、ベンゼンを対象に、生物学的メカニズムに基づいた新たなリスク評価体系の枠組みの開発を模索する。

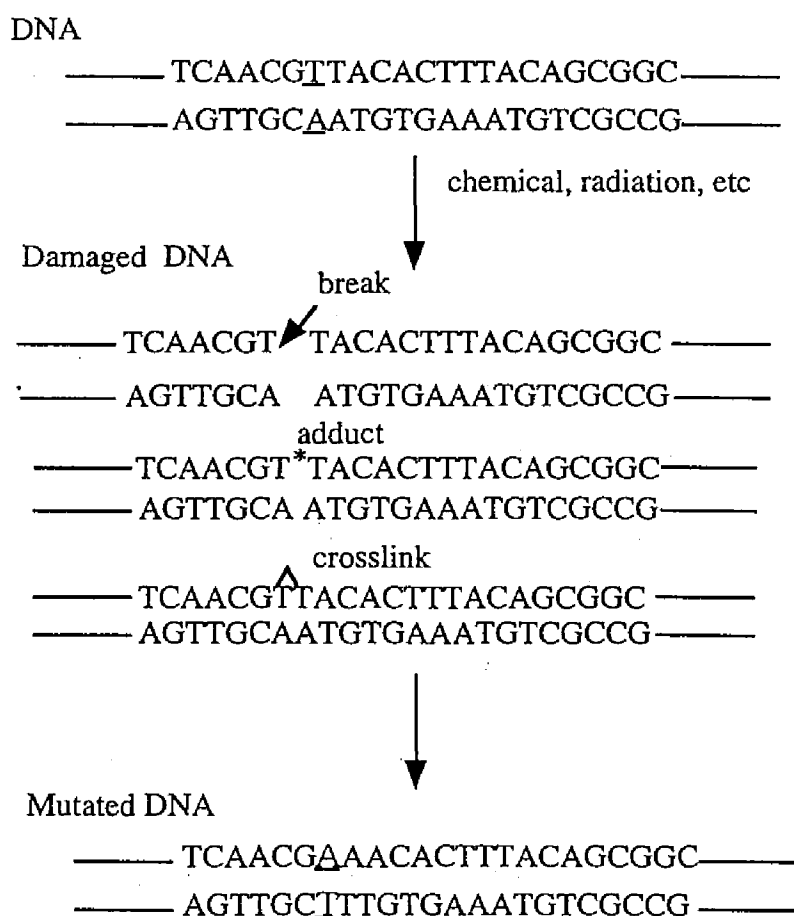


Fig. 1-2 DNA損傷による突然変異の誘発

1.3 ベンゼン

ベンゼンは、ヒトに白血病を誘発する発がん性物質である。米国EPAによると、 $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ のベンゼンに70年間曝露されたときの白血病誘発リスクは、 8×10^{-6} と推定されている[4]。ベンゼンの排出源は主に自動車排ガスであるが、タバコの煙中にも多く含まれており、能動喫煙、受動喫煙共に曝露原因となりうる。WHOは、非喫煙者のベンゼンの摂取量を $130\sim 550\mu\text{g}/\text{day}$ 、一般的な喫煙者で約 $2\text{mg}/\text{day}$ と推定している[5]。ベンゼンの曝露源は、非喫煙者の場合、屋外大気が約40%、屋内大気が約30%であるのに対して、喫煙者の場合は、その約90%がタバコによるものである[6]。

日本では、環境庁がベンゼンを有害大気汚染物質のうちの「優先取り組み物質」と指定し、平成9年に環境基準値 ($3\mu\text{g}/\text{m}^3$)を設定した。また、平成12年4月からガソリンのベンゼン濃度は1%以下と規制されている。しかし、現在でも環境基準値を越えるベンゼンが多くの地域で観測されている[7]。

ベンゼン自体は、反応性の低い、安定な物質である。ベンゼンが体内に吸収されたときも、摂取経路に関わらず、約40%はそのまま排出されるが、残りの60%は体内の代謝酵素により、さまざまな化合物に代謝される[8]。ベンゼンの主な体内代謝産物とその代謝経路をFig. 1-3 参照に示す。体内に取り込まれたベンゼンは主に肝臓や骨髄においてシトクロームP450酵素群などによりフェノール、カテコール、ハイドロキノンなどへと代謝され、その後さらに他の物質へと代謝される。代謝により生成した物質の内には、細胞毒性や変異原性を持つものがあり、これらが発がんのイニシエーターとして働くと考えられている。

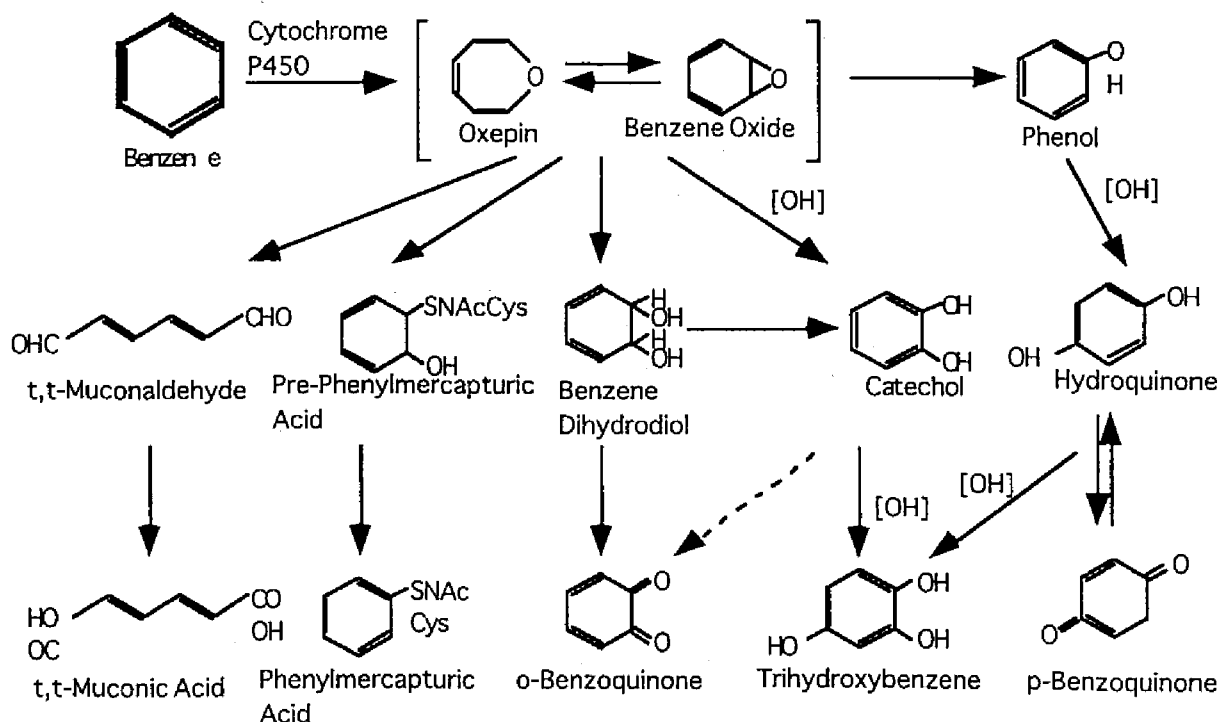


Fig. 1-3 ベンゼンの代謝

1.4 本研究の目的と論文の構成

本研究の最終的な目標は、新しい健康リスク評価のための技術体系の枠組みを作ることである。この目標を達成するために、以下の研究目的を設定する。

- (1)ベンゼンの代謝生成物について、突然変異頻度、突然変異スペクトルを実験的に解析し、ベンゼン代謝物による突然変異に表れる細胞種差の影響や、白血病誘発のイニシエーターとして最も強く作用する代謝生成物を検討する。
- (2)ベンゼンの代謝生成物が細胞の核内で誘発する遺伝子の損傷、突然変異の誘発という分子レベルでの変化に関する実験データに依拠し、生物学的メカニズムに基づいて、ヒトに白血病が誘発されるリスクを評価するモデルを提示する。

ベンゼンは、既に述べたようにヒトに白血病を誘発する化学物質として知られており、その環境基準値はヒトに対する疫学調査結果に基づいて定められている。本研究で、研究対象物質をベンゼンとその代謝生成物質に設定した理由を以下に述べる。

本研究では、白血病誘発の生物学的メカニズムに基づいて、試験管内で行う分子生物学的および細胞生物学の実験データから、ヒトに白血病が誘発される確率を推定する枠組みを提示する。この枠組みの信頼性を検証するためには、ヒトについての疫学データが存在することが不可欠の要件である。また、ベンゼンはガソリン中に含まれる他、タバコの排煙、環境水中にも含まれており、ヒトに対する現実的な曝露とその健康リスクが懸念される物質でもある。将来的には、ベンゼンについて検証された健康リスク評価の枠組みを、疫学調査データのない物質に対して、予防的に適用する方向に研究を進める予定である。

以下に本論文の構成と内容を示す。

第1章では、本研究の対象物質をベンゼンとその代謝生成物質に定めると共に、本研究の目的を設定する。

第2章では、マウス細胞における突然変異解析ツールとして構築するシャトルベクタープラスミド pNY200について述べる。これは、発がんの第1ステップである突然変異について、実験動物であるマウスとヒトとの種差は表れるか否か、同一の試験系を用いて、細胞レベルで比較するために構築したプラスミドである。

第3章では、シャトルベクタープラスミド pNY200を用いて、ベンゼン代謝物パラベンゾキノンの突然変異解析をマウス細胞について行う。

第4章では、第3章と同一試験系を用いて、ベンゼン代謝物パラベンゾキノンの突然変異解析をヒト細

胞について行い、マウス細胞における突然変異解析結果と比較する。

第5章では、第4章と同一試験系を用いて、ベンゼン代謝物ムコンアルデヒドの突然変異解析をヒト細胞について行う。

同じく第6章では、第4章と同一試験系を用いてベンゼン代謝物ハイドロキノンの突然変異解析をヒト細胞について行う。

第7章では、第4, 5, 6章の実験結果を相互に比較することで、ベンゼンによる白血病誘発のイニシエーターとして最も強く作用する代謝生成物質について検討する。

第8章では、ベンゼンに曝露されることで、ベンゼン代謝物がヒトに誘発する白血病のイニシエーションの定量化を試みる。

第9章では、本研究で得られた成果をまとめるとともに、今後の検討すべき課題について述べる。

参考文献

1. Johansen, F.R., *Risk assessment of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals*, Crit Rev Toxicol, 1990, 20(5), p. 341-67.
2. Office of Technology Assessment, *Assessment of technologies for determining cancer risks from the environment*, 1981, Washington D.C., U.S. Government Printing Office.
3. U.S. E.P.A., *Draft report: A cross-species scaling factor for carcinogen risk assessment based on equivalence of mg/kg³/4/day*, 1992, p. 24151-24173.
4. U.S. E.P.A., *Guidelines for carcinogen risk assessment*, Federal Register 61(79), 1996, p. 17960-18011.
5. World Health Organization, *Air Quality Guideline for Europe Copenhagen*, 1987, WHO Regional Publication.
6. Wallace, L., *Environmental exposure to benzene: an update*, Environ Health Perspect, 1996, 104 Suppl 6, p. 1129-36.
7. 環境庁大気保全局, 平成10年度地方公共団体等における有害大気汚染物質モニタリング調査結果, 1998.
8. Parke, D.V., *Personal reflections on 50 years of study of benzene toxicology*, Environ Health Perspect, 1996, 104 Suppl 6, p. 1123-8.

第2章 シャトルベクターpNY200の構築

2.1 はじめに

シャトルベクタープラスミドは2種類の宿主細胞中で複製できるように作られた環状DNAであり、遺伝子工学上非常に有用なツールである。なかでもシャトルベクタープラスミドpZ189とその誘導体[1, 2]は、ヒト細胞における発がん物質による突然変異を分子レベルで評価するために広く用いられている。

本章では、ヒト細胞ではなく、マウス細胞を用いて突然変異の頻度および種類の解析が行えるよう、マウス細胞内で複製できるシャトルベクターを新たに構築する。

従来、発がんリスク評価には、マウスなどのげっ歯類の動物実験による結果を人に外挿するという手法がとられてきた。しかし、そこに実験動物とヒトとの種差は正確に反映されていない。環境変異原により誘発される突然変異をマウス細胞とヒト細胞とで比較することは、実験動物とヒトとの種差を考察するための重要な情報となり、ヒトの健康リスク評価に重要な情報を与えることになる。

突然変異解析によく用いられるシャトルベクタープラスミドpZ189はアンバーサプレッサーtRNA遺伝子である*supF*遺伝子を利用している。*supF*遺伝子には、他の遺伝子のアンバー変異（本来アミノ酸をコードしていたコドンナンセンスコドンUAGとしてしまう突然変異）を、UAGコドンチロシンのコードとして識別することによって抑制する働きがある。したがって、アンバー変異により機能を失った遺伝子を持つ大腸菌は*supF*遺伝子をもつシャトルベクタープラスミドが導入されると、その遺伝子はアンバー変異が抑制されて本来の機能を取り戻す。しかし、*supF*遺伝子に変異があれば機能は失われたままである。

pZ189の場合は、抗生物質耐性遺伝子の機能の抑制と回復という現象を利用して突然変異解析を行う。*supF*遺伝子は176塩基対からなる小さな遺伝子であるため迅速な塩基配列分析が可能であり、多数のサンプルの分析に適している。マウス細胞における突然変異の情報蓄積に努めることができるよう、本章でも突然変異の標的に*supF*遺伝子を持つシャトルベクターを構築する。

*supF*遺伝子を利用して行う一般的な突然変異試験の概要をFig 2-1に示す。

まずシャトルベクターは変異原によりDNA損傷を与える。その後培養細胞に導入し、細胞内で損傷の修復、突然変異の固定、複製を行わせる。その後、大腸菌に導入し*supF*遺伝子上の突然変異のスクリーニングを行う。*supF*遺伝子上の突然変異のスクリーニングには、プラスミドpKY241を導入した大腸菌株KS40（KS40/pKY241と表す）を用いる。

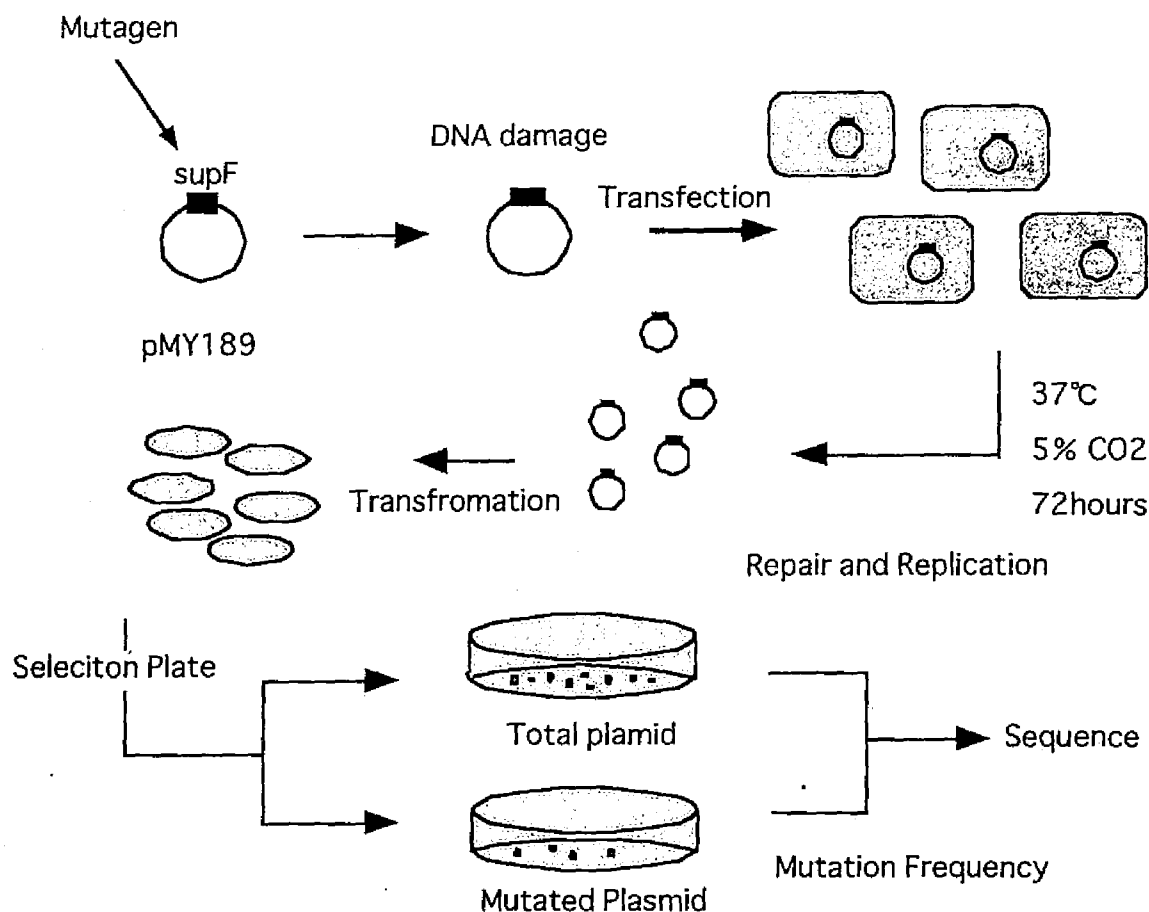


Fig. 2-1 シャトルベクターを用いた突然変異試験方法

KS40は、*lacZ*遺伝子にアンバー変異を持った大腸菌株MBM7070（遺伝型; *lacZ(am)* CA7070 *lacY1 HsdR HsdM Δ(araABC-leu)7679 galU galK rpsL thi*）から得られた変異株で、ナリジキシン酸耐性になるような突然変異を起こした*gyrA*遺伝子をもつ。pKY241はクロラムフェニコール耐性遺伝子とアンバー変異を起こした*gyrA*遺伝子を持っている[3]。KS40/pKY241に*supF*遺伝子が導入されると、pKY241の*gyrA*遺伝子のアンバー変異は*supF*遺伝子により抑制されるためpKY241の*gyrA*遺伝子からはGyrAタンパクが生産され、一方、染色体の*gyrA*遺伝子からはナリジキシン酸耐性GyrAタンパクが生産される。このとき、ナリジキシン酸感受性の表現系がナリジキシン酸耐性の表現系に対して支配的となり、KS40/pKY241はナリジキシン酸感受性となる。これに対し、KS40/pKY241に変異*supF*遺伝子が導入されると、pKY241の*gyrA*遺伝子のアンバー変異は抑制されず、染色体の*gyrA*遺伝子から生産されるナリジキシン酸耐性GyrAタンパクが支配的となり、KS40/pKY241はナリジキシン酸耐性を獲得する。つまりナリジキシン酸を含まない培地では、変異の有無に関わらず*supF*遺伝子が導入された大腸菌はすべてコ

コロニーを形成することが可能であり、ナリジキシン酸を含む培地では、変異した*supF*遺伝子の導入された大腸菌のみがコロニーを形成する。

また、KS40/pKY241は、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子である*lacZ*にもアンバー変異を持っているので、変異を持った*supF*遺伝子が導入されるとX-Gal-IPTGを塗布したLB培地上で白色または青白色のコロニーを形成し、導入された*supF*遺伝子が正常な場合には青色のコロニーを形成する。本研究では変異体をナリジキシン酸とX-Gal-IPTGにより、二重にセレクションをかけた上で突然変異の解析を行う。

2.2 シャトルベクターpNY200の構築

2.2.1 試薬および細胞

本研究ではマウス細胞HL18は皮膚がん細胞から森脇ら[4]が構築したものを、ヒト細胞WI38-VA13[5]はAmerican Type Culture Collection から購入したものを使用した。培養は10%牛胎児血清 (Hyclone, U.S.A.) 入りDulbecco's modified minimum essential medium (Nikken Seibutsu, Kyoto) を用い、5%CO₂、湿度100%、37℃の条件下でおこなった。

また、大腸菌株KS40/pKY241[3]は大阪府立公衆衛生研究所の赤坂氏から提供していただいた。この大腸菌の培養は、LB培地 (Bacto-tryptone 10g/L、Bacto-yeast extract 5g/L、NaCl 10g/L、Agar 15g/L含有) を用い、37℃の条件下で行った。

使用した試薬は特に記載しない限り、ナカライテスク社製である。

2.2.2 シャトルベクターpNY200の構築

シャトルベクタープラスミドpMY189はpZ189の誘導体の一つであり、*supF*遺伝子の塩基配列をDye-Primer Cycle Sequencing法を用いて370A automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, USA, CA) で直接分析できるようプライマー配列が組み込まれている[6]。

シャトルベクターpNY200は、ヒト細胞で複製するために必要なSV40遺伝子をpMY189から取り除き、代わりにマウス細胞で複製するようポリオーマ T遺伝子と複製点を組み込むことにより以下の手順で構築した。実験手順の概要はFig.2-2に示す。

プラスミドpPyBamHIには、ポリオーマウイルスA2株の全ゲノムが組み込まれている。プラスミドpPyBamHIを制限酵素HincIIで処理し、その制限部位にBamHI linker (Promega, USA) をつなげた後、制限酵素BamHIで処理しポリオーマウイルスの複製起点およびT抗原遺伝子を含む3.6kbのフラグメントを切り出した。一方、pMY189からは、制限酵素BamHIで処理することによりヒト細胞内で複製するために必要であったSV40ウイルスの複製起点およびT抗原遺伝子を取り除き、2.5kbのフラグメントを切り出した。これら二つのフラグメントをつなげることで、6.1kbのマウス細胞内での複製が可能な突然変異解析

プラスミドpNY200を構築した。二つのフラグメントのライゲーションには、DNAライゲーションキット（Takara, Kyoto）を用いた。pNY200の構造の概略図をFig.2-3に示す。

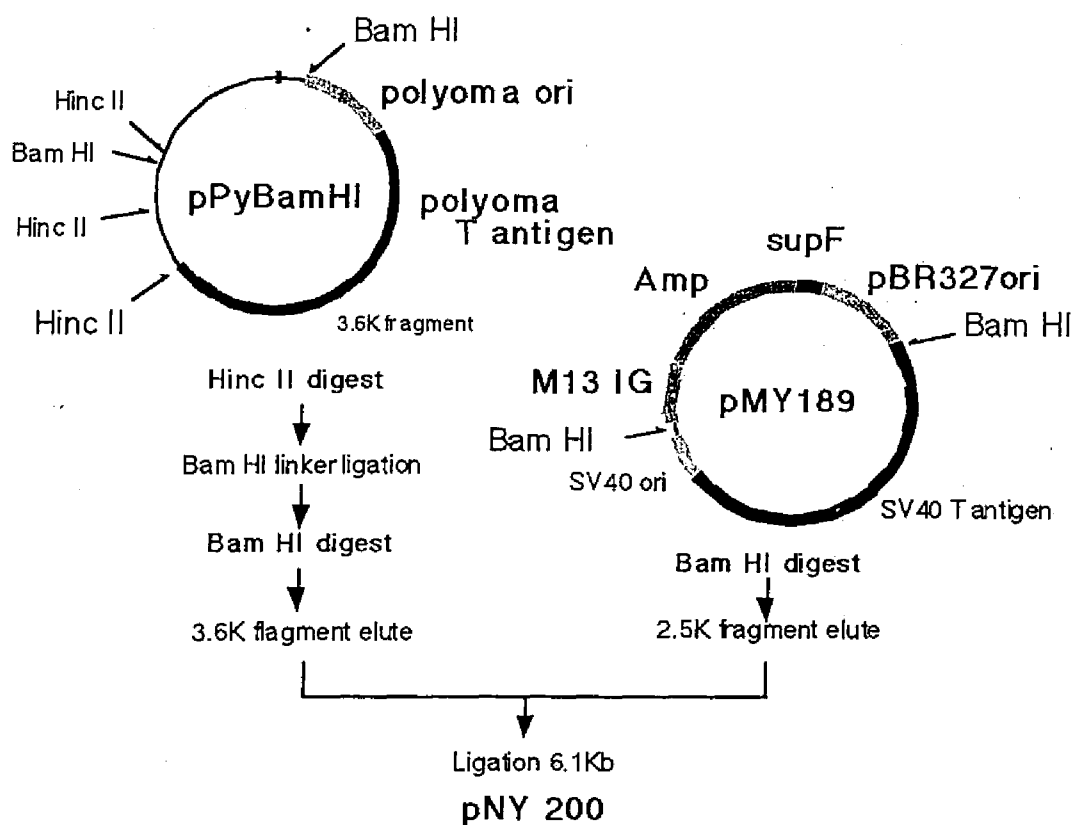


Fig. 2-2 シャトルベクターpNY200の作成手順

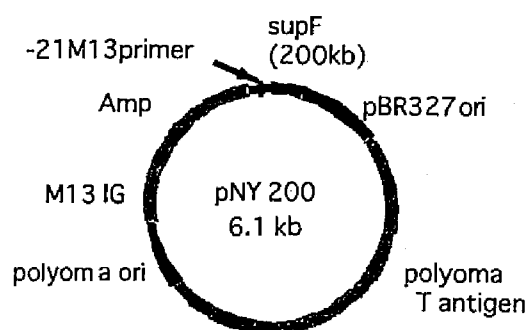


Fig. 2-3 シャトルベクタープラスミドpNY200

2.3 pNY200の複製能および変異原検出能の確認

2.3.1 確認手順

シャトルベクターpNY200がマウス細胞内での複製能を持つことを確認するため、マウス細胞HL18に導入した。またヒト細胞中では複製能を有しないことを確認するため、ヒト細胞WI38-VA13に導入した。さらに変異原の検出が可能であることを確認するために、紫外線を照射したシャトルベクターを用いた。比較の対照としてヒト細胞内での突然変異の解析に用いられているpMY189を用いた。

pNY200をマウス細胞HL18およびヒト細胞WI38-VA13 (3×10^7 個)にトランスフェクション（導入）し、これを72時間培養することによって細胞内でシャトルベクターの複製およびDNA損傷の修復、突然変異の固定を行わせた。トランスフェクションには、直流電流を与えることで細胞に微孔をあけてDNAを導入するエレクトロポレーション法（電気穿孔法）を採用した。エレクトロポレーションは、電極間距離0.3cmのチャンバーを用いて、Gene Transformation Electroporation System（Toyobo、大阪）により600Vの電圧を5回かけることで行った。

その後、72時間培養した細胞から、プラスミド回収キット（QIAprep-spin Plasmid kit, Qiagen, USA）を用いてプラスミドを回収した。回収したpNY200は、制限酵素Dpn1（NEB,UK）で処理することにより、大腸菌由来のメチル化されたものを除去し、マウス細胞またはヒト細胞内で複製されたもののみを残した。

pMY189についても同様の手順により、マウス細胞HL18およびヒト細胞WI38-VA13にトランスフェクション（導入）し、プラスミドを回収した。

2.3.2 突然変異頻度の決定

細胞から回収したシャトルベクターをE.coli Pulser（Biorad、U.S.A）を用いて、インジケーター大腸菌KS40/pKY241にトランスフォーメーション（導入）し、正常な*supF*遺伝子と変異*supF*遺伝子を持ったシャトルベクターとを選別するため2種類の選択培地に蒔き、37℃で24時間培養した。

選択培地は2種類の抗生物質（アンピシリン150 μ g/mL、クロラムフェニコール30 μ g/mL）を含有するLB培地（ACプレート）と、3種類の抗生物質（ナリジキシン酸50 μ g/mL、アンピシリン150 μ g/mL、クロラムフェニコール30 μ g/mL）を含有するLB培地（ACNプレート）とを準備した。後者の培地には変異*supF*遺伝子選択のためX-Gal-IPTGを塗布したのを用いた。

pMY189にはアンピシリン耐性遺伝子が組み込まれており、またpKY241にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれている。さらに、KS40/pKY241は*supF*遺伝子上に変異を生じたpMY189が導入されるとナリジキシン酸にも耐性を持つようになる。このため、pMY189を導入されたKS40/pKY241は*supF*遺伝子上の変異の有無に関わらずACプレート上でコロニーを形成することができ、変異*supF*遺伝子を導入

されたKS40/pKY241はACNプレート上でもコロニーを形成することができるようになる。また、インジケーター大腸菌KS40/pKY241は、変異*supF*遺伝子をもつpMY189が導入されるとX-Gal-IPTGを塗布したLB培地上で白色または青白色のコロニーを形成し、導入された*supF*遺伝子が正常な場合には青色のコロニーを形成するため、*supF*遺伝子の変異を確認することができる。

つまり、ACプレート上のコロニー数からはpMY189の総数（The number of total colony）が、X-Gal-IPTGを塗布したACNプレート上に形成された白いコロニーの数からは突然変異の起きたpMY189の数（The number of mutant colony）がそれぞれ求められる。

以下の式から、pNY200およびpMY189の生存率を意味する相対コロニー数と、突然変異の起こる割合を表す突然変異頻度を算定した。

$$\text{相対コロニー数(at p-BQ X mM)} = \frac{\text{The number of total colony (at p-BQ X mM)}}{\text{The number of total colony (at p-BQ 0 mM)}} \times 100 (\%)$$

$$\text{突然変異頻度(at p-BQ X mM)} = \frac{\text{The number of mutant colony (at p-BQ X mM)}}{\text{The number of total colony (at p-BQ X mM)}}$$

2.3.3 実験結果および考察

細胞によるシャトルベクターの回収量およびミュータント量、突然変異頻度をTable 2-1に示した。回収量はACNプレートに生えたトータルコロニー数で把握することができる。同表からpNY200はヒト細胞WI38-VA13に導入するとあまり複製してないが（コロニー数が3,425）、マウス細胞HL18に導入すれば効率よく複製し（コロニー数は49,450）、マウス細胞内での選択的な複製が可能であり、突然変異解析に十分なプラスミドの回収も可能であることがわかる。反対にpMY189はヒト細胞では複製するが、マウス細胞ではほとんど複製できないことを確認した。pNY200をマウス細胞内に導入し、決定された自然突然変異頻度は 1.1×10^{-4} であった。またUV1,000J/m²照射により誘発された突然変異の頻度は 1.4×10^{-2} と自然突然変異頻度の約100倍となった。一方pMY189をヒト細胞VA13に導入したところ、自然突然変異、およびUV1,000J/m²による突然変異の頻度は、それぞれ 5.6×10^{-4} 、 4.0×10^{-3} であり、pNY200を用いることにより、既にその使用可能性が確認されているpMY189と同様に、突然変異の検出とその定量が可能であることを確認した。

Table2-1 ヒト細胞VA13およびマウス細胞HL18における
各プラスミドの回収量と突然変異頻度

plasmid	cell	untreated			UV-irradiated		
		total	mutant	mutation frequency	total	mutant	mutation frequency
pNY200	human	3,425	1	2.92×10^{-4}	2,350	5	2.23×10^{-3}
	mouse	49,450	6	1.11×10^{-4}	700	10	1.43×10^{-2}
pMY189	human	110,600	62	5.61×10^{-4}	44,900	182	4.04×10^{-3}
	mouse	19	0	-	8	0	-

2.4 まとめ

本章で得た結論を以下にまとめる。

- (1) 本研究で新たに構築したシャトルベクタープラスミドpNY200は、様々な環境変異原の特性をマウス細胞を用いて検出することができ、この試験系は発がん試験のスクリーニング法として有効な手段となりうる。
- (2) すでに開発されているシャトルベクタープラスミドpMY189と組み合わせて用いることにより、細胞レベルではあるが、変異原のマウスとヒトとの間での特性の相違を把握することができる。すなわち、シャトルベクタープラスミドpNY200をpMY189と組合わせて使用する試験系は、細胞レベルであるが、突然変異に関する種差を特定する有効なパラメーターを提供するものと期待される。

参考文献

1. Kraemer, K.H. and M.M. Seidman, *Use of supF, an Escherichia coli tyrosine suppressor tRNA gene, as a mutagenic target in shuttle-vector plasmids*, *Mutat Res*, 1989, 220(2-3), p. 61-72.
2. Levy, D.D., et al., *Sequence specificity of aflatoxin B1-induced mutations in a plasmid replicated in xeroderma pigmentosum and DNA repair proficient human cells*, *Cancer Res*, 1992, 52(20), p. 5668-73.
3. Akasaka, S., et al., *G:C->T:A and G:C->C:G transversions are the predominant spontaneous mutations in the Escherichia coli supF gene: an improved lacZ(am) E. coli host designed for assaying pZ189 supF mutational specificity*, *Mol Gen Genet*, 1992, 235(2-3), p. 173-8.
4. Moriwaki, S., et al., *Analysis of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in a shuttle vector plasmid propagated in mouse O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient cells in comparison with proficient cells*, *Cancer Res*, 1991, 51(23 Pt 1), p. 6219-23.
5. Girardi, A.J., et al., *SV40-induced transformation of human diploid cells, crisis and recovery*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1965, 65, p. 69-84.
6. Matsuda, T., et al., *Molecular analysis of mutations induced by 2-chloroacetaldehyde, the ultimate carcinogenic form of vinyl chloride, in human cells using shuttle vectors*, *Carcinogenesis*, 1995, 16(10), p. 2389-94.

第3章 マウスHL18細胞を用いたパラベンゾキノンによる突然変異の解析

3.1はじめに

ベンゼン自体は本来安定な物質であり反応性に乏しい。そのためベンゼンによるヒトの健康リスクを評価するには、代謝生成物（Fig.1-3 参照）の毒性評価が重要である。本研究では一連のベンゼン代謝物について、シャトルベクターを用いて突然変異の解析を行う。シャトルベクターを用いる試験系の最大の長所はスピードである。突然変異のターゲット遺伝子 *supF* の長さは176bと短く、多くのサンプルについて遺伝子の塩基配列変化をスピーディーに調べることができる。突然変異のタイプやスペクトルに関する情報を蓄積するのに適している。本研究では、まずシャトルベクターを用いて、一連のベンゼン代謝物が誘発する突然変異を解析することにより、ヒトの健康リスク評価に必要な情報を蓄積する。

本章では、ベンゼン代謝物のひとつであるパラベンゾキノン（*p*-Benzoquinone：以後 *p*-BQ）に注目して突然変異の解析を行った。Fig.1-3に示すようにベンゼンの代謝物は多種生成するが、なかでも *p*-BQはベンゼンの毒性に寄与する究極活性物質であると考えられている[1]。 *p*-BQは、Fig3-1の構造式に示されるように、カルボニル基をパラ位に2つ持つ、反応性の高い物質である。

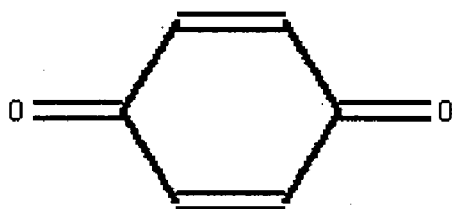


Fig. 3-1 *p*-BQの構造

p-BQが初めて合成されたのは、1938年頃で、当時は年間約1,000kg製造されていたが、1975年に製造工場は閉鎖されている。主要な用途は、染料、合成中間体、酸化剤、皮革のなめし剤などである。

p-BQの毒性については、皮膚や眼に対する強い刺激性、動物実験で催腫瘍性が報告されている[2]。しかしIARCは *p*-BQのヒトに対する発がん評価をGroup 3に分類、すなわち“The agent is not classifiable as to its carcinogenicity to humans”としている。ちなみに変異原性試験に関するこれまでの報告では、Ames試験で陽性、SCE（姉妹染色分体交換試験）では陽性である。

3.2 シャトルベクターを用いた突然変異の解析

3.2.1 試薬および細胞

本研究において用いた試薬は、特に記載しない限りナカライテスク社製の生化学用試薬または特級試

薬である。

マウス細胞HL18は皮膚がん細胞から森脇ら[3]が構築したものをを用いた。培養は10%牛胎児血清 (Hyclone, U.S.A.)入りDulbecco's modified minimum essential medium (Nikken Seibutsu, Kyoto) を用い、5%CO₂、湿度100%、37℃の条件下でおこなった。また、大腸菌株は大阪府立公衆衛生研究所の赤坂氏から提供していただいたKS40/pKY241[4]を用いた。この大腸菌は、LB培地 (Bacto-tryptone 10g/L, Bacto-yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L, Agar 15g/L含有) を用い、37℃の条件下で培養した。

3.2.2 *p*-BQによるシャトルベクターpNY200の処理と細胞への導入

シャトルベクターpNY200 (9.5 μg)は、ギ酸アンモニウム (pH7.4) 存在下のTE溶液中で*p*-BQとで37℃、16時間混和させ、そのDNAに損傷を生じさせた。反応液の総体積は500 μLである。*p*-BQ処理濃度は0, 2.7, 7.4, 9.3mMの4濃度とした。

ただし、可視光の照射により*p*-BQがDNA鎖を切断することが電気泳動により確認された (Fig.3-2 参照) ので、遮光条件下で処理を行った。

Fig.3-2は、可視光を5[min]から16[hours]まで照射しながら*p*-BQ処理したプラスミドと、無処理および遮光条件下で*p*-BQ処理したプラスミドの電気泳動写真である。可視光の照射時間が長くなると、スーパーコイル型 (超らせん構造) のプラスミドの存在両が減少し、代わりにオープンサーキュラー型 (開環構造) のプラスミドの存在量が増加する。可視光を120[min]~照射したときにはリニア型 (線状構造) のプラスミドの存在が確認できる。オープンサーキュラー、リニアは、それぞれスーパーコイル型プラスミドに1本鎖切断、2本鎖切断が生じることで生成する。

反応終了後エタノール沈殿によりプラスミドを回収し、ついで分画分子量30,000のフィルター SUPREC TM-02 (Takara, Kyoto)を用いてDNAと反応せずに残った*p*-BQを除去し、pNY200を精製した。精製したpNY200は、マウス細胞HL18にトランスフェクションし、72時間培養した。その後プラスミドを回収しインジケーター大腸菌KS40/pKY241にトランスフォームし、選択培地に播種した。実験手順の詳細は第2章に記述した通りである。

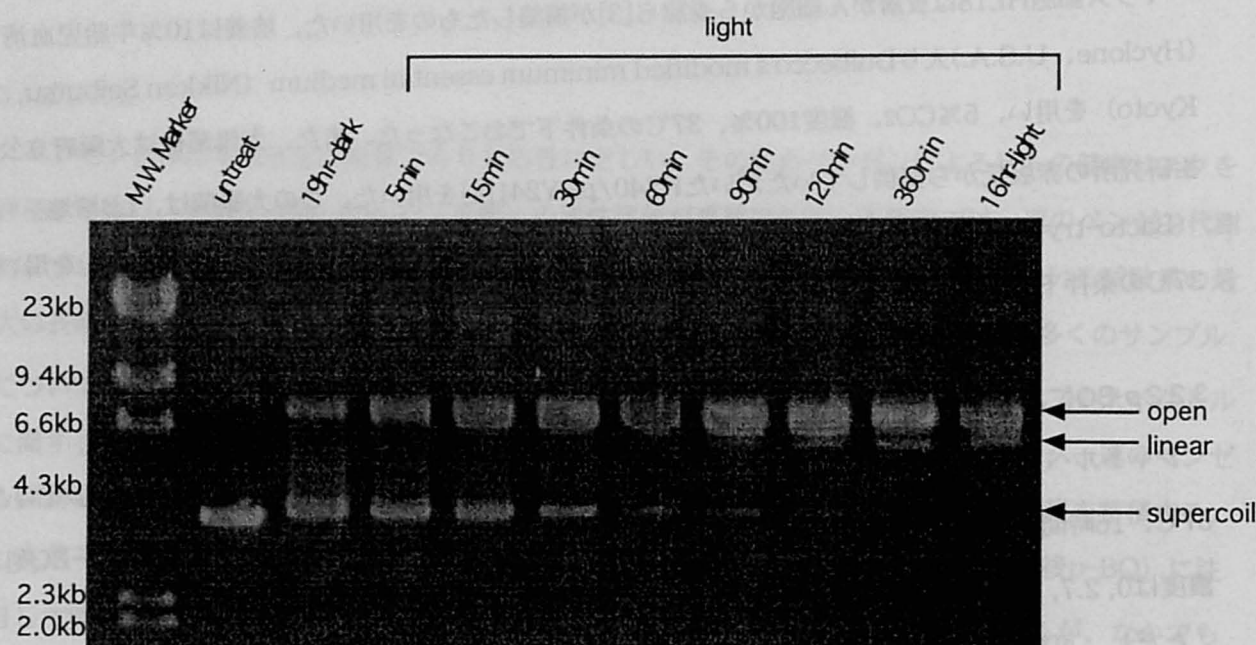


Fig. 3-2 可視光照射によるp-BQのDNA鎖切断

3.2.3 変異supF遺伝子の塩基配列の決定

変異supF遺伝子をもつコロニーをピックアップし、抗生物質を含む液体培地中でオーバーナイト培養の後、QIAGENのプラスミド抽出キット (QIAprep-spin Plasmid kit) を用いてpNY200を回収し、アガロースゲル電気泳動によりプラスミドのサイズを調べ、大きな挿入や欠失の見られるものを除いた。その後、正常なサイズのpNY200のsupF遺伝子について、Dye-Primer Cycle Sequencing reagent Kitと370A automatic DNA sequencerとを用いてsupF遺伝子の塩基配列を調べた。同時に自然突然変異のsupF遺伝子についても塩基配列を調べた。

3.2.4 ^{32}P -ポストラベル法によるDNA付加体の検出

p-BQよりDNA付加体が形成されることを ^{32}P -ポストラベル法を用いて確認した。 ^{32}P -ポストラベル法 (Fig.3-3参照) とは、DNAの構成単位であるヌクレオシドのうち付加体が形成されているもののみを抽出し、これを ^{32}P でラベルし、薄層クロマトグラフ(TLC)展開することにより、オートラジオグラムにて視覚的に検出するという方法である[5,6]。また、 ^{32}P で標識した全ヌクレオシド量を放射能測定により把握しておけば、付加体の放射能との比から相対的な付加体形成量、すなわち1塩基につき付加体がいくつ形成されるか、を知ることができる。 ^{32}P -ポストラベル法の概略をFig.3-3に示す。

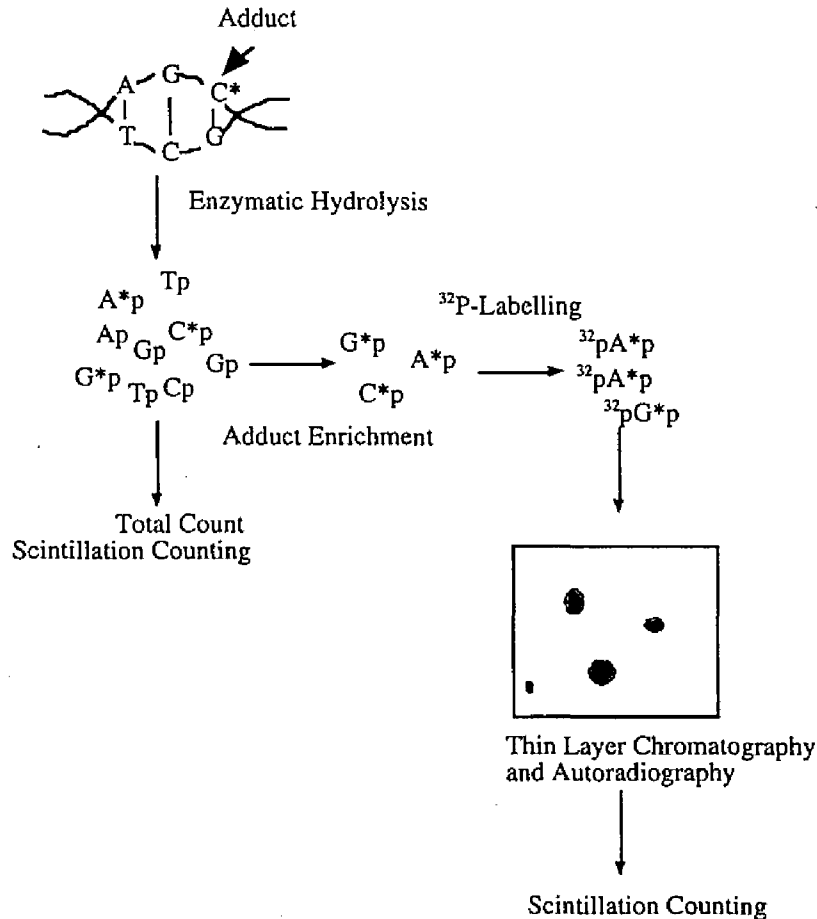


Fig. 3-3 ^{32}P -ポストラベリング法の実験手順

まず $p\text{-BQ}$ によりプラスミド $p\text{NY200}$ ($9.5\mu\text{g}$) に DNA 損傷を与えた。処理方法は 3.2.2 に述べた通りである。処理濃度は 7.4mM とした。

$p\text{-BQ}$ で処理されたプラスミド $p\text{NY200}$ を DNA の構成単位であるヌクレオシドに分解するためには、マイクロコッカルヌクレース酵素およびスプリーンフォスフォディエステラーゼ酵素 (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) を用いた。ヌクレオシド単位に分解されたサンプルの一部は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($3,000\text{Ci/mmol}$) を用いて γ 位の P を ^{32}P でラベルし、精製した後、液体シンチレーションカウンタによりトータルの放射能を測定した。残りのサンプルから正常なヌクレオシドを分解するためにヌクレース P1 酵素 (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) で処理し、付加体が形成されたヌクレオシドのみを濃縮し、 ^{32}P でラベルした。これを PEI-Cellulose TLC (Thin Layer Chromatography) 展開し、オートラジオグラムから付加体を検出した。またクロマト展開したセルロースシートから付加体が形成されているヌクレオシドを掻き取り、放射能を測定、トータル放射能との比から相対的付加体形成量を算定した。

3.2.5 ストップアッセイによるDNA付加体の形成サイトの決定

p-BQによって*supF*遺伝子に誘発された突然変異の直接的原因が、DNA付加体形成であるか否かを調べるため、付加体形成サイトと突然変異サイトとが一致するか否か、ポリメラーゼストップアッセイ[7-9]により確認した。ポリメラーゼストップアッセイの概略をFig.3-4に示す。

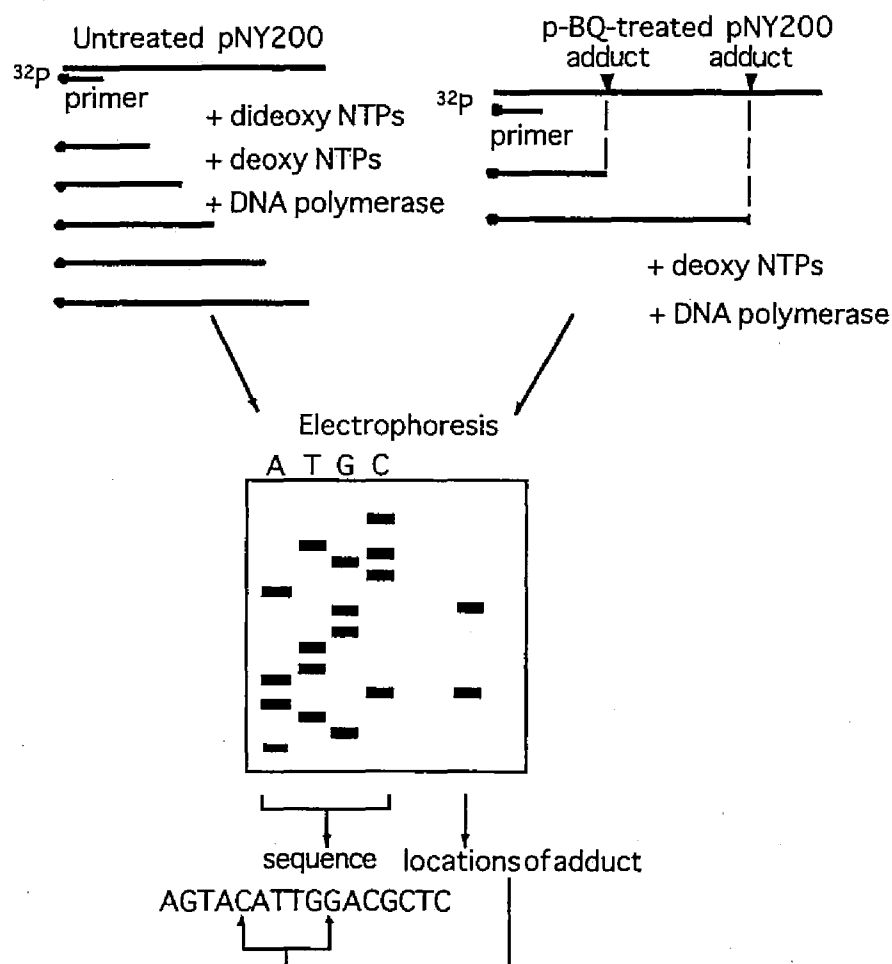


Fig. 3-4 ポリメラーゼストップアッセイの実験手順

1983年に考案されたPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）という技術は、任意のDNA配列を鋳型に、その相補鎖を大量に増幅する技術である[10,11]が、ポリメラーゼによるDNAの伸長反応は鋳型となるDNAの損傷サイトでストップしてしまう。この特徴を利用したのがポリメラーゼストップアッセイである。まず*p*-BQによりプラスミドpNY200（9.5 μg）にDNA損傷を与えた。処理方法は3.2.3に述べた通りである。処理濃度は7.4mMとした。プラスミドは、DNAの構成単位であるdNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)と、5'端を[γ-³²P]ATP（3,000Ci/mmol）で放射性ラベルしたコーディング鎖のプライマー5'-GTATCACGAGGCCCTT-3'（Takara,Kyoto）あるいはノンコーディング鎖のプライマー5'-

TTCTACGGGGTCTGACGC-3' (Nippon Seihun, Tokyo) と混合し、Tth DNA polymerase (Toyobo, Osaka) を用いてDNAの伸長反応を進行させた。反応生成物は、ポリアクリルアミドゲル中を電気泳動させることで長さごとに分離した。長さごとに分離したDNAは、オートラジオグラムによりバンドとして検出した。一方、無処理のプラスミドpNY200をSequencing Pro Kit (Toyobo, Osaka) を用いて、dideoxy chain termination法により1塩基ごとに伸長したDNA鎖を作成、先の付加体解析用サンプルと同様に放射性ラベルし、これを処理プラスミドと並列してポリアクリルアミドゲル中を電気泳動させることで、損傷サイトが*supF*遺伝子上のどのサイトにあたるかを決定した。相対的な付加体形成量の推定は、オートラジオグラフのバンドの濃度をNIH Image Analysis Softwareにより解析することで行った。

3.3 実験結果

3.3.1 プラスミド回収率と突然変異頻度

マウス細胞内で複製させたプラスミドpNY200の生存率を表す相対コロニー数をFig.3-5(A)に、*supF*遺伝子の突然変異頻度をFig.3-5(B)に示す。これらの結果は実験を3回繰り返し、その平均値と標準偏差とで示したものである。相対コロニー数はp-BQの濃度依存的に減少しており、p-BQの濃度が9.3 mMのときにはバックグラウンドの1.1%程度に減少している。相対コロニー数が減少するのは、pNY200がp-BQとの混和によって損傷を受け、それをヒト細胞が修復しきれないときに、pNY200が分解されたり、pNY200のアンピシリン耐性遺伝子、ポリオーマウイルスのT抗原遺伝子、複製起点などプラスミドの複製・維持に不可欠な部分に突然変異が生じたためである。つまり、この結果から、p-BQがシャトルベクターpNY200に致命的な損傷を与えたことがわかる。

一方、シャトルベクターpNY200の*supF*遺伝子に誘発された突然変異頻度はp-BQの濃度依存的に増加しており、バックグラウンド (p-BQ濃度0 mM) では 2.4×10^{-4} であった突然変異頻度は、p-BQの濃度が9.3 mMのときには 2.2×10^{-2} と約100倍に増加している。突然変異頻度が増加するのは、p-BQの濃度に依存して*supF*遺伝子が受ける損傷が多くなり、それをマウス細胞HL18が修復できずに突然変異として固定されてしまう割合が大きくなるためである。

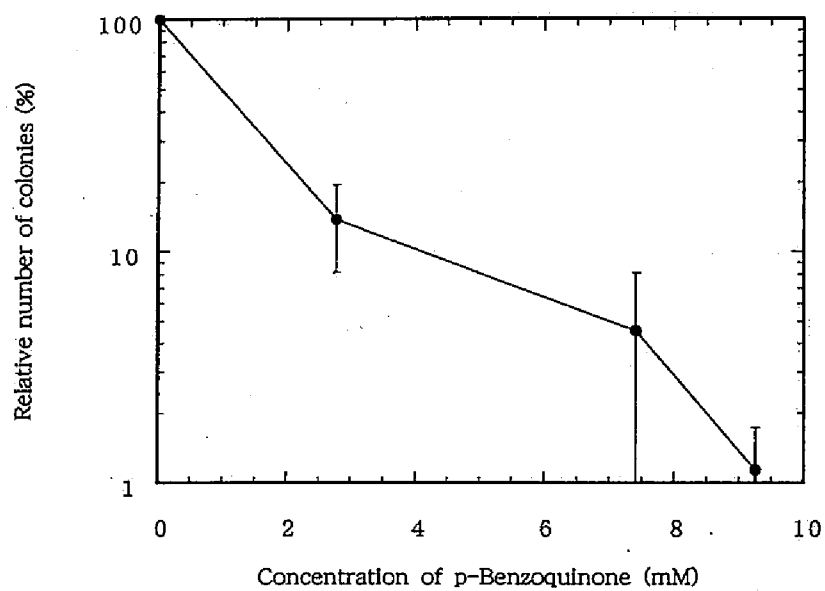


Fig. 3-5 (A) 相対コロニー数

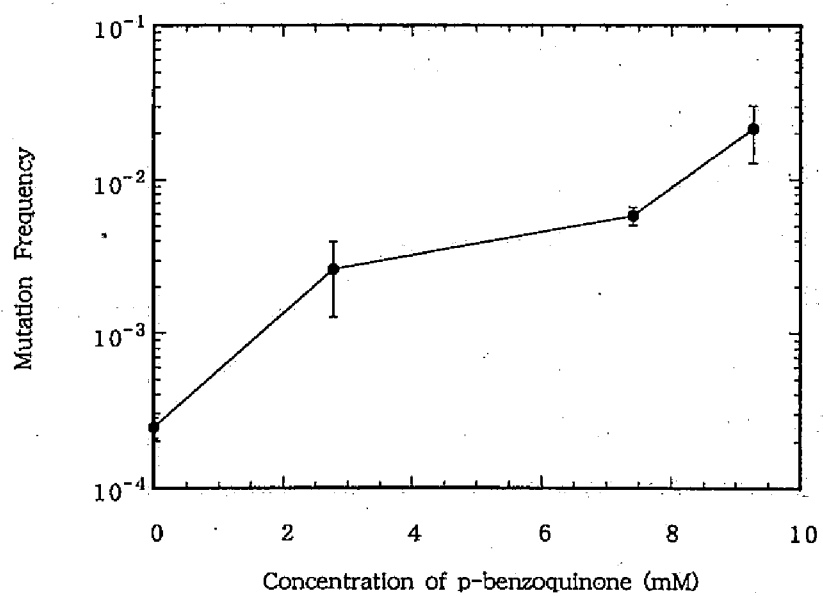


Fig. 3-5 (B) 突然変異頻度

3.3.2 突然変異の内訳

370A automatic DNA sequencerを用いて、変異*supF*遺伝子の塩基配列を調べた。*p*-BQにより誘発された突然変異のタイプを、自然突然変異とともにTable3-1に示す。

突然変異はBase substitution（塩基対置換）、Frameshift（フレームシフト：翻訳のずれ）、deletion（欠失）、insertion（挿入）、others（その他）の大きく5つのカテゴリーに分類し、塩基対置換はさらに、1塩基置換のsingle、隣あった2塩基が置換するtandem、数塩基が同時に置換するmultipleの3つに分類した。

Table 3-1より、自然突然変異、*p*-BQ誘発突然変異のいずれの場合も最も多い変異のタイプは塩基置換で、自然突然変異では全体の48.6%、*p*-BQによる突然変異では全体の84.0%を占めていることがわかる。自然突然変異では、塩基対の欠失（deletion）が32.4%と非常に多く見られたが、*p*-BQによる突然変異では*supF*遺伝子上に複数の1塩基対置換が起こるmultiple base substitutionが多い。また、*p*-BQによる突然変異には見られない塩基対の挿入（insertion）が自然突然変異で多く見られる(8.1%)のに対し、*p*-BQによる突然変異には1塩基の脱落であるフレームシフトが多く見られた(14%)。

Table 3-1 自然突然変異および
p-BQ誘発突然変異における突然変異の内訳

Types of mutation	spontaneous		<i>p</i> -BQ-induced	
	number	%	number	%
Base substitution	18	48.7	42	84.0
single	15	40.5	12	24.0
tandem	1	2.7	15	30.0
multiple	2	5.4	16	32.0
Frameshift	2	5.4	8	16.0
-1 deletion	1	2.7	7	14.0
+1 insertion	1	2.7		
Deletion	12	32.4	0	0.0
Insertion	3	8.1	0	0.0
Others*	2	5.4	0	0.0
Total	37	100.0	50	100.0

*Deletion と塩基対置換、またはフレームシフトの同時誘発

Table3-2には塩基置換の内訳を示した。DNAを構成する塩基はプリン塩基（グアニン、アデニン）とピリミジン塩基（シトシン、チミン）とに分けられ、塩基対置換はTransition（同性塩基置換）型、Transversion（異性塩基置換）型に分類され、全部で6種の塩基変換が可能である。すなわち、二つの同性塩基置換（A:T→G:C, G:C→A:T）と4つの異性塩基置換（A:T→T:A, A:T→C:G, G:C→C:G, G:C→A:T）である。自然突然変異ではG:C塩基対からT:A塩基対へのtransition型の置換（同性塩基対置換）が最も多く、全体の57.1%を占めている。次に多かったのがA:T塩基対からT:A塩基対への置換で14.3%である。p-BQによる突然変異ではG:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く（52.8%）、次に多いのがG:C塩基対からT:A塩基対への置換であった（29.2%）。

Table 3-2 自然突然変異および
p-BQ誘発突然変異における塩基対置換の内訳

Base substitution	spontaneous		p-BQ-induced	
	number	%	number	%
Transition	18	48.7	42	84.0
G:C to A:T	15	40.5	12	24.0
A:T to G:C	1	2.7	15	30.0
Transversion	2	5.4	8	16.0
G:C to T:A	1	2.7	7	14.0
G:C to C:G	1	2.7		
A:T to T:A	12	32.4	0	0.0
A:T to C:G	3	8.1	0	0.0
Total	37	100.0	50	100.0

*Deletion と塩基対置換、またはフレームシフトの同時誘発

3.3.3 突然変異スペクトル

自然突然変異およびp-BQによる突然変異のスペクトルをFig.3-6に示す。supF遺伝子の塩基配列の上下に、塩基対置換が起きたサイトおよび置換した塩基を示した。自然突然変異のホットスポットは、119、123、129、145、153、154残基目で、最も顕著なホットスポットは123残基目であった。一方p-BQによる突然変異では142、150、153、158、159 残基目がホットスポットであった。

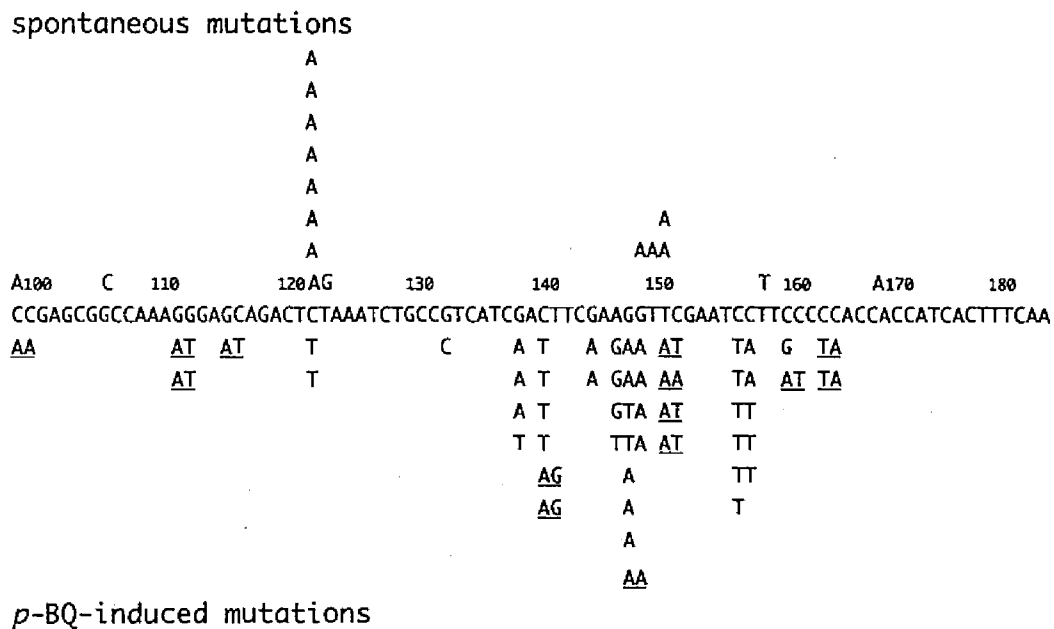


Fig. 3-6 自然突然変異(上段) およびp-BQ誘発突然変異 (下段) の突然変異スペクトル

3.3.4 付加体の検出

³²Pポストラベル法により作成した付加体マップをFig.3-7に示す。Fig.3-7(A)は無処理のプラスミドを、Fig.3-7(B)はp-BQで処理したプラスミドを、それぞれ展開したオートラジオグラフである。両図ともに展開開始位置である原点付近にスポットが確認できるが、これは正常なヌクレオチドが残存したものである。Fig.3-7(B)にはメジャースポットが3つ (No.1-3)、マイナースポットが2つ (No.4,5)、合計5つのスポットが確認できた。この結果は、p-BQによる付加体は少なくとも5種類存在することを示唆している。最も大きなスポットNo.3での相対的付加体量は1ヌクレオチドあたり 4.4×10^{-5} であった。また総付加体量を、1プラスミドあたりで算出すると 8.5×10^{-2} となった。同濃度 (7.4mM) のp-BQで処理したプラスミドpNY200の突然変異頻度は、 5.8×10^{-3} である (Fig. 3-5参照) であり、付加体量の約10%である。

Fig.3-7(A) 無処理プラスミド
による付加体マップ

Fig.3-7(A) *p*-BQ処理による
付加体マップ

3.3.5 *p*-BQ付加体形成サイト

ポリメラーゼストップアッセイにより推定した*p*-BQ付加体サイトをFig.3-8に示す。横軸は、*supF*遺伝子の塩基配列であり、縦軸は相対的な付加体形成量を示す。付加体が多く見られたのはコーディング鎖の94、118、128、139、142、145、148、150残基目と相補鎖の130、131、158、159、162、163残基目であった。またC,A,G塩基に多くの付加体が形成されていた。

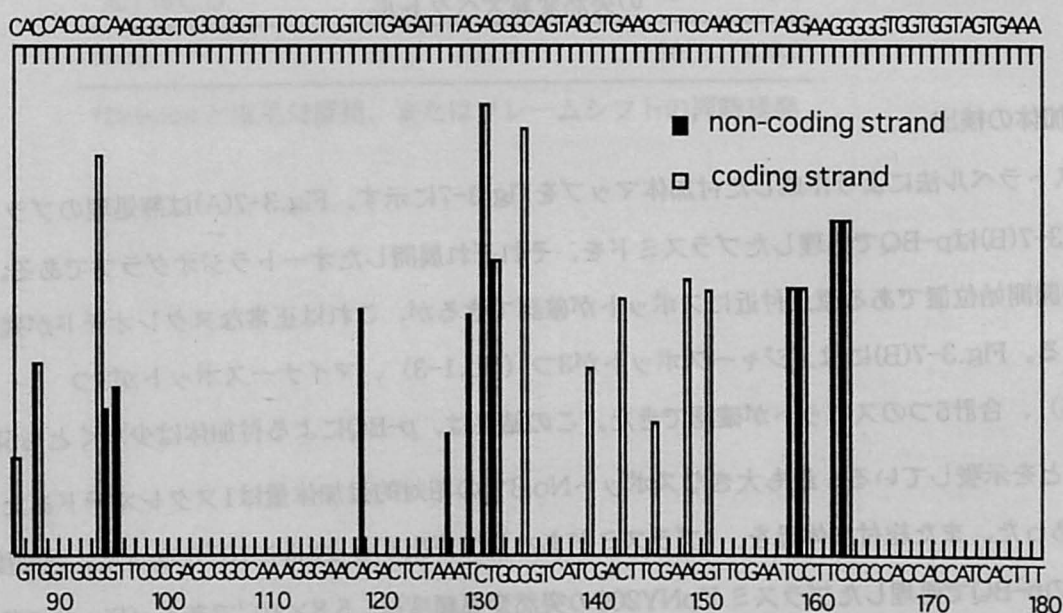


Fig. 3-8 *supF*遺伝子における付加体形成サイトおよび突然変異サイト

3.4 考察

相対コロニー数は p -BQの濃度依存的に減少しており、濃度9.3 mMの p -BQで処理した際の相対コロニー数はバックグラウンドの1.14%程度になっている (Fig.3-5(A)参照)。相対コロニー数が減少するのは、pNY200が p -BQとの反応によってDNA損傷を受け、その損傷をヒト細胞WI38-VA13が修復しきれず、複製がうまく行えなくなり、結果としてpNY200の回収率が低くなるためである。また、相対コロニー数が p -BQの濃度依存的に減少しているのは、 p -BQの濃度増加に応じてpNY200が受けるDNA損傷が多くなるからである。

一方、突然変異頻度は p -BQの濃度依存的に増加しており、バックグラウンド (p -BQ濃度0 mM) では 2.4×10^{-4} だった突然変異頻度は p -BQ濃度9.26 mMにおいては 2.2×10^{-2} と約100倍になった (Fig.3-5(B)参照)。突然変異頻度が p -BQ濃度依存的に増加するのは、 p -BQ濃度に応じてプラスドの変異ターゲットである $supF$ 遺伝子が受ける損傷が多くなり、その損傷が修復ミスにより突然変異として固定されるためである。これらの結果からヒト細胞WI38-VA13において p -BQは強い変異原性を示すことがわかった。

また、変異 $supF$ 遺伝子の塩基配列を分析した結果、自然および p -BQ誘発のいずれにの突然変異においても、最も多い変異のタイプは塩基対置換で、自然突然変異の48.7%、 p -BQによる突然変異の84.0%を占めている。しかし自然突然変異では p -BQによる突然変異には見られない数10~100塩基以上の欠失 (deletion) が多く見られた (Table3-1参照)。これは「ヒト、サル、チャイニーズハムスターなど哺乳類の細胞にpZ189系のシャトルベクターを導入すると、自然突然変異におけるdeletionとinsertionの割合が増加する」という報告[12-14]と一致する。

また、 p -BQによる突然変異にはタンデム型の塩基対置換とframeshift型の変異 (特に1塩基の脱落) が多く見られたのが自然突然変異とは異なる特徴であった。これについては2点の可能性を考えることができる。2塩基の置換が起こる原因について2点考察している。1点は、 p -BQがDNAと形成したbulky adduct (巨大な付加体) [15]の修復過程で起こるエラーに起因するのではないかとこの可能性、もう1点は高濃度の p -BQで処理しているため、隣り合った2塩基に損傷が生じたため起きたという可能性である。

p -BQによる1塩基置換の内容 (Table3-2参照) を調べると、G:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く (52.8%)、次に多いのがG:C塩基対からT:A塩基対への置換 (29.2%) であり、A:T塩基対の置換に比べG:C塩基対の置換がはるかに多かった (84.3%)。また、A塩基またはT塩基への置換 (69.8%) (相補鎖であるため両者の区別はできない) がG塩基またはC塩基への置換 (30.2%) に比べて多く見られるが、これは、DNA修復酵素が修復をおこなう際に、どの塩基を導入するのが正しいのか分からないとき、A塩基を優先的に導入するという法則、いわゆる"Arule"[9]が働いたためであると思われる。

る。これらの結果から、*p*-BQが*supF*遺伝子のC、G塩基に与えた損傷がA塩基への置換が誘導されたものと思われる。

自然突然変異におけるホットスポットは123残基目で、これに対して*p*-BQによる突然変異では142, 150, 153, 158, 159残基目がホットスポットとなっていた (Fig.3-6参照)。両者には123、153残基目のように共通するホットスポットが見られる一方で、113残基目や150残基目のように*p*-BQによる突然変異でのみホットスポットとなっているところもあった。これは自然突然変異とは異なる、*p*-BQに特有の突然変異の機構が存在することを示唆している。

³²Pポストラベル法により*p*-BQ付加体を検出した (Fig.3-7参照)。スポットは合計5つあり、少なくとも5種類の付加体の存在が考えられる。最も大きなスポットNo.3での相対的付加体量はヌクレオチドあたり 4.4×10^{-6} であった。また総付加体量は、プラスミドあたり 8.5×10^{-2} である。これは同濃度の*p*-BQで処理した場合の突然変異頻度 5.8×10^{-3} の100倍強程度であるが、培養細胞の修復能を考えると付加体のみが突然変異に寄与しているとは考えにくく、ポストラベル法では検出できない*p*-BQによるbulkyなアダクト以外の損傷 (例えば酸化的ダメージ、DNA鎖切断) の存在の可能性も考えられる。

ポリメラーゼストップアッセイの結果からはG、C、A塩基とよく付加体を形成していることがわかった (Fig.3-7参照) が、これは*p*-BQはDNAのG、C、A塩基と付加体を形成するという従来の報告[15, 16]と一致しており、本研究で確認した塩基対置換の内訳 (Table3-2)を支持すると考えられる。

p-BQの付加体が多く見られたのはコーディング鎖の94、118、128、139、142、145、148、150残基目と相補鎖の130、131、158、159、162、163残基目で、*p*-BQによる突然変異のホットスポットと150、158、159残基目は一致している (2)。だが、第128、139、162残基などでは多くの付加体が形成されているにもかかわらず*p*-BQによる塩基対置換はあまり見られなかった。これはDNAの高次構造が修復過程に影響を与えるためではないかと考えられる。

付加体の形成に関わらず変異が見られない原因は、DNAの高次構造と修復のメカニズムの関与が考えられるが、突然変異のホットスポットもしくはその付近で付加体が多く形成されていることから*p*-BQによる付加体の形成が突然変異に大きく関与していると考えられる。

3.5 まとめ

本章で得られた結果を以下にまとめる。

- (1) マウス細胞において*p*-BQは強い変異原性を示すことを確認した。
- (2) 変異*supF*遺伝子の塩基配列により自然突然変異とは異なる*p*-BQ特有の突然変異の機構が存在することが示唆された。
- (3) さらに*p*-BQが*supF*遺伝子のC、G塩基に与えた損傷によりA塩基への置換が生じたものと思われ

る。

- (4) 7.4mM *p*-BQによる総付加体量は、プラスミドあたり 8.5×10^{-3} であり、ポストラベル法では検出できない*p*-BQによるbulkyなアダクト以外の損傷 (ex.酸化的ダメージ、DNA鎖切断) の存在の可能性も考えられる。
- (5) 突然変異のホットスポットもしくはその付近で付加体が多く形成されていることから*p*-BQによる付加体の形成が突然変異に大きく起因していると考えられる。

参考文献

1. Goldstein, B.D. and G. Witz, *Benzene*, In *Environmental Toxicants Human Exposure and Their Health Effects*, M. Lippmann(Editor), 1992, Van Nostrand Reinhold, New York. p. 76-97.
2. Rappaport, S.M., *Threshold limit values, permissible exposure limits, and feasibility: the bases for exposure limits in the United States*, Am J Ind Med, 1993, 23(5), p. 683-94.
3. Moriwaki, S., et al., *Analysis of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in a shuttle vector plasmid propagated in mouse O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient cells in comparison with proficient cells*, Cancer Res, 1991, 51(23 Pt 1), p. 6219-23.
4. Akasaka, S., et al., *G:C->T:A and G:C->C:G transversions are the predominant spontaneous mutations in the Escherichia coli supF gene: an improved lacZ(am) E. coli host designed for assaying pZ189 supF mutational specificity*, Mol Gen Genet, 1992, 235(2-3), p. 173-8.
5. Nath, R.G., et al., *A 32P-postlabeling method for simultaneous detection and quantification of exocyclic etheno and propano adducts in DNA*, Carcinogenesis, 1994, 15(5), p. 979-84.
6. Reddy, M.V., *32P-Postlabelling analysis of small aromatic and of bulky non-aromatic DNA adducts*, in *Postlabelling methods for detection of DNA adducts*, M.C.a.H.B. D.H. Phillips (Editor), 1993, IARC Scientific Publications, Lyon, p. 25-34.
7. Levy, D.D., et al., *Sequence specificity of aflatoxin B1-induced mutations in a plasmid replicated in xeroderma pigmentosum and DNA repair proficient human cells*, Cancer Res, 1992, 52(20), p. 5668-73.
8. Mah, M.C., et al., *Replication of acetylaminofluorene-adducted plasmids in human cells: spectrum of base substitutions and evidence of excision repair*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(22), p. 10193-7.
9. Sagher, D. and B. Strauss, *Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides*, Biochemistry, 1983, 22(19), p. 4518-26.
10. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, Methods Enzymol, 1987, 155, p. 335-50.
11. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986, 51(Pt 1), p. 263-73.
12. Calos, M.P., et al., *High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80(10), p. 3015-9.
13. Ashman, C.R. and R.L. Davidson, *High spontaneous mutation frequency in shuttle vector sequences recovered from mammalian cellular DNA*, Mol Cell Biol, 1984, 4(11), p. 2266-72.
14. Yang, J.L., et al., *Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of (+/-)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene replicates in human cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(11), p. 3787-91.
15. Hang, B., et al., *An unusual mechanism for the major human apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease involving 5' cleavage of DNA containing a benzene-derived exocyclic adduct in the absence of an AP site*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(24), p. 13737-41.
16. Singer, B., *DNA damage: chemistry, repair, and mutagenic potential*, Regul Toxicol Pharmacol, 1996, 23(1 Pt 1), p. 2-13.

第4章 ヒトWI38-VA13細胞を用いたパラベンソキノン誘発突然変異の解析

4.1 はじめに

「がん」は閾値のない（異論はあるにせよ）確率的な影響であると考えられている。環境中に存在し、ヒトへの曝露および影響が懸念される発がん物質については、ヒトの発がんリスクが環境基準を決める重要なファクターである。しかし、ヒトの発がんリスクを評価しようとしても、当該物質に関してリスク評価に必要な疫学調査等の結果や生物学的な情報を得ることは極めて難しい。現在、定量的な発がんリスク評価は、実験動物を用いた発がん試験結果をヒトに外挿することで行われるのが一般的である。この種間外挿は、主として体重比や体表面積比などの情報に基づいて行われる[1]。

しかし、実験動物においても系統や雌雄が異なれば、発がん試験の結果が異なる場合も確認されている。マウスの中には肝腫瘍の自然発生率の高い系統もあり、実際、発がん試験によく用いられるB6C3F1マウスは遺伝的に肝がんがイニシエートされた状態であると考えられている[2]。EPAのリスクアセスメントガイドラインでは、高用量群にのみ肝腫瘍発生の増加が見られる場合や、変異原試験の結果が陰性または明確でない、肝腫瘍発生の増加が雄あるいは雌のみに見られる場合には、ケースバイケースで発がん性を評価すべきであるとしている[3]。また毒性の発現に密接に関与する薬物代謝活性や、その経路に動物種差があることが確認されている[4,5]。その他に、化学物質の細胞およびDNAとの相互作用、その修復といった発がんの本質的過程に種差が存在することも十分に考えられる。発がんリスク評価を定量的に行うためには、より慎重に生物学的メカニズムを検討する必要がある。

突然変異は発がんの第1ステップである。「突然変異という事象に種差はあるのか？」この問題に答えることは、生物学的メカニズムに基づいた発がんリスク評価に重要な情報を与えることになるであろう。

本章では第3章のマウスHL18細胞に代えて、正常ヒト細胞を用い、ベンゼンの究極活性代謝物 p -BQ[6]による突然変異解析を行い、 p -BQによる突然変異という分子レベルの事象についてヒト細胞とマウス細胞との種差を考察する。本研究では、正常ヒト細胞として、ヒト線維芽細胞種WI38-VA13[7]を用いる。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬および細胞

本研究で使用した正常ヒト線維芽細胞種WI38-VA13[7]はAmerican Type Culture Collection (Rockville, U.S.A.) より購入した。培養は10%牛胎児血清 (Hyclone, U.S.A.) 入りDulbecco's modified minimum essential medium (Nikken Seibutsu, Kyoto) を用い、5%CO₂、湿度100%、37℃の条件下でおこなった。

試薬は特に記載しない限りナカライテスク社製の生化学用試薬または特級試薬を使用した。

4.2.2 実験手順

p-BQによるシャトルベクタープラスミドpMY189の処理および細胞・大腸菌への導入方法は第3章に記した通りである。

4.3 実験結果

4.3.1 プラスミド回収率と突然変異頻度

ヒトWI38-VA13細胞内で複製させたプラスミドの生存率を表す相対コロニー数（濃度0mMで処理したときのコロニー数を100%とする）をFig.4-1(A)に、*supF*遺伝子の突然変異頻度をFig.4-1(B)に示す。各図には第3章で得られたヒトWI38-VA13細胞における結果を並記した。これらの結果は実験を3回繰り返し、その平均値と標準偏差とを示している。

相対コロニー数すなわちプラスミドの生存率はp-BQの濃度依存的に減少しており、p-BQの濃度が9.3mMのときにはバックグラウンドの1.38%程度に減少している。相対コロニー数が減少するのは、pMY189がp-BQと化学的な反応をおこすことによって、そのDNAが損傷を受け、その損傷をヒトWI38-VA13細胞が修復できず、従って複製がうまく行えなくなったpMY189は、回収率が低下するためである。また、相対コロニー数がp-BQの濃度依存的に減少しているのは、p-BQの濃度に応じてpMY189が受けるDNA損傷が多くなるからである。

一方、突然変異頻度はp-BQの濃度依存的に増加しており、バックグラウンド（p-BQ濃度0 mM）では 7.8×10^{-4} であった突然変異頻度はp-BQの濃度が9.3 mMのときには 1.4×10^{-2} と約18倍に増加している。突然変異頻度が増加するのは、p-BQの濃度に依存して*supF*遺伝子が受ける損傷が多くなり、それをヒトWI38-VA13細胞WI38-VA13が修復できずに突然変異として固定される割合が大きくなるためである。

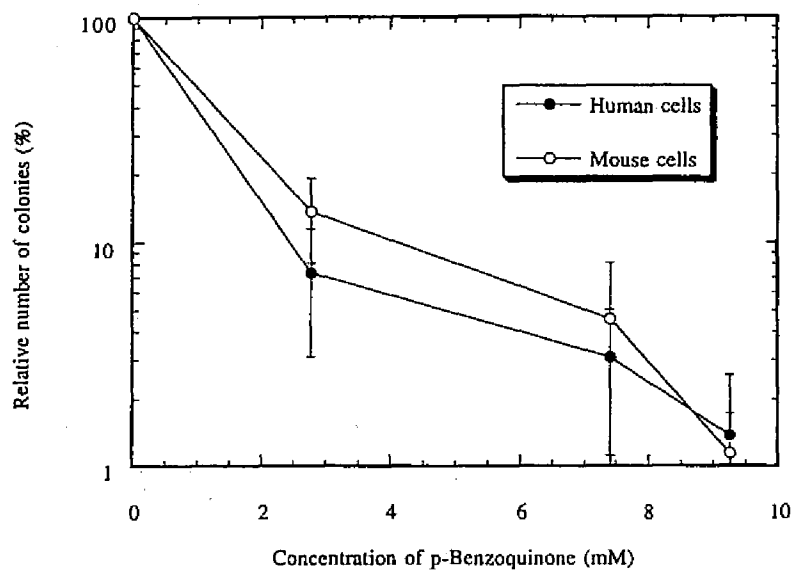


Fig. 4-1 (A) プラスミド回収率

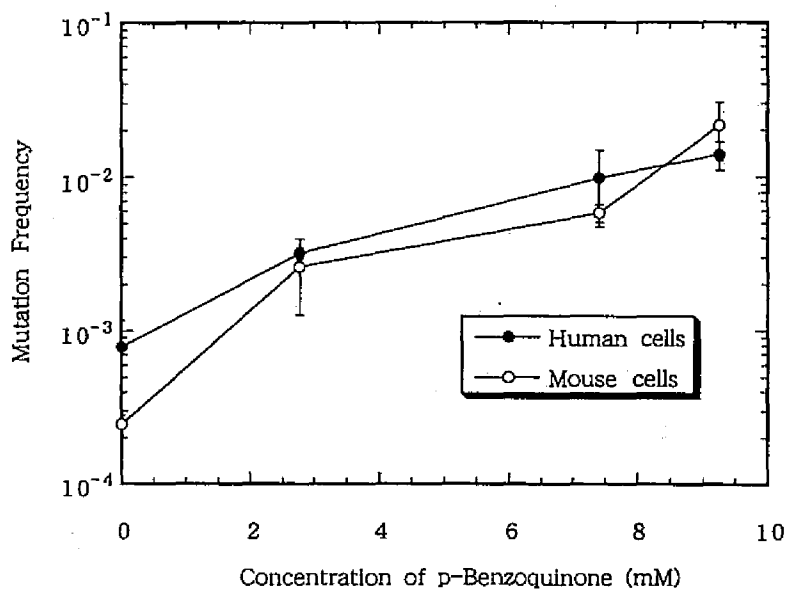


Fig. 4-2 (B) 突然変異頻度

4.3.2 突然変異の内訳

選択培地から単離した変異*supF*遺伝子について、その塩基配列を調べた。得られたp-BQによる突然変異と自然突然変異の内容を、第3章で得られたマウスHL18細胞における突然変異の内訳と併せてTable 4-1に示す。突然変異はBase substitution (塩基対置換)、Frameshift (フレームシフト：翻訳のずれ)、deletion (欠失)、insertion (挿入)、others (その他)の大きく5つのカテゴリーに分類

し、塩基対置換はさらに、1塩基置換のsingle、隣りあった2塩基が同時に置換するtandem、数塩基が同時に置換するmultipleの3つに分類した。

Table 4-1より、最も多い突然変異は、*p*-BQに誘発されたものも自然突然変異も塩基対置換で、それぞれ全体の73.9%(自然)、80.2% (*p*-BQ)を占めている。自然突然変異では*supF*遺伝子上に複数の塩基対置換 (multiple) が非常に多く見られたが、*p*-BQによる突然変異では*supF*遺伝子上に1カ所だけ1塩基対置換が起こっているもの (single) が多い。また、自然突然変異では*p*-BQによる突然変異には見られない数10~100塩基以上のdeletion (欠失) が多く見られる (19.6%) のに対し、*p*-BQによる突然変異には1塩基の脱落によるフレームシフトが多く見られた (8.1%)。

Table 4-1 ヒト細胞WI38-VA13、マウス細胞HL18における
自然突然変異および*p*-BQ誘発突然変異

Type	human cell				mouse cell			
	spontaneous		<i>p</i> -BQ-induced		spontaneous		<i>p</i> -BQ-induced	
	number	%	number	%	number	%	number	%
Base substitution	34	73.9	69	80.2	18	48.6	42	84.0
single	11	23.9	51	59.3	15	40.5	12	24.0
tandem	1	2.2	3	3.5*	1	2.7	14	28.0*
multiple	22	47.8	15	17.4	2	5.4	16	32.0
Frameshift	0	0.0	7	8.1	2	5.4	7	14.0
-1 base	0	0.0	7	8.1	1	2.7	7	14.0
+1 base	0	0.0	0	0.0	1	2.7	0	0.0
Deletion	9	19.6	3	3.5	12	32.4	0	0.0
Insertion	1	2.2	0	0.0	3	8.1	0	0.0
Others	2	4.3	7	8.1	2	5.4	1	2.0
Total	46	100.0	86	100.0	37	100.0	50	100.0

Table4-2には塩基置換の内訳を、第3章で得られたマウスHL18細胞における塩基対置換の内訳と併せて示した。DNAを構成する塩基はプリン塩基 (グアニン、アデニン) とピリミジン塩基 (シトシン、チミン) とに分けられ、塩基対置換はTransision (同性塩基置換) 型、Transversion (異性塩基置換) 型に分類され、全部で6種の塩基変換が可能である。すなわち、二つの同性塩基置換 (A:T→G:C,G:C

→A:T) と4つの異性塩基置換 (A:T→T:A, A:T→C:G, G:C→C:G, G:C→A:T) である。

Table 4-2でも、確認された塩基対置換を大きくTransision (同性塩基置換) 型、Transversion (異性塩基置換) 型に分類し、さらにそれぞれの型の塩基置換に分類した。Table 4-2より自然突然変異ではG:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換 (同性塩基対置換) が最も多く、全体の39.5%を占めていることが分かる。次に多かったのがG:C塩基対からT:A塩基対への置換で、これにG:C塩基対からC:G塩基対への置換を含めると全体の97.5%を占めることになり、A:T塩基対の置換はほとんど (2.5%) 見られない。p-BQによる突然変異ではG:C塩基対からT:A塩基対への置換が最も多く (37.5%)、次に多いのがG:C塩基対からA:T塩基対への置換であり (32.3%)、こちらもA:T塩基対の置換に比べてG:C塩基対の置換がはるかに多い (87.5%) が、自然突然変異の場合よりも多くのA:T塩基対の置換が見られる。

Table 4-2 ヒト細胞WI38-VA13、マウス細胞HL18における
自然突然変異およびp-BQ誘発突然変異の塩基対置換

Base subsitution	human cell				mouse cell			
	spontaneous		p-BQ-induced		spontaneous		p-BQ-induced	
	number	%	number	%	number	%	number	%
Transittion	32	39.5	31	27.1*	2	10.5	39	73.6*
G:C to A:T	32	39.5	26	67.7*	2	10.5	34	64.2*
A:T to G:C	0	0.0	5	22.9*	0	0.0	5	9.4
Transversion	49	60.5	65	2.1	17	89.5	14	26.4*
G:C to T:A	28	34.6	36	32.3*	11	57.9	10	18.9*
G:C to C:G	19	23.5	22	5.2	2	10.5	2	3.8*
A:T to T:A	0	0.0	5	37.5*	2	10.5	1	1.9
A:T to C:G	2	2.5	2	5.2	2	10.5	1	1.9
Total	81	100.0	96	100.0	19	100.0	53	100.0

* p<0.05 Fisher's exact testにて有意

4.3.3 突然変異スペクトル

自然突然変異および*p*-BQ誘発突然変異のスペクトルをFig.4-2(A),(B)に示した。Fig.4-2(A)には*supF*遺伝子の塩基配列の上下に、それぞれマウスHL18細胞およびヒトWI38-VA13細胞における自然突然変異スペクトルを、Fig.4-2(B)には*p*-BQ誘発突然変異スペクトルを示した。

ヒトWI38-VA13細胞の自然突然変異のホットスポットは、119、123、129、146、153、154残基目であった。一方*p*-BQ誘発突然変異では113、123、146、150、153、158残基目がホットスポットであった。123、146、153残基目のように両者においてホットスポットになっている位置もあるが、113残基目や150残基目のように*p*-BQが誘発した突然変異でのみホットスポットとなっている位置もある。この実験結果は、自然突然変異とは異なる*p*-BQ特有の突然変異の機構が存在することを示唆している。

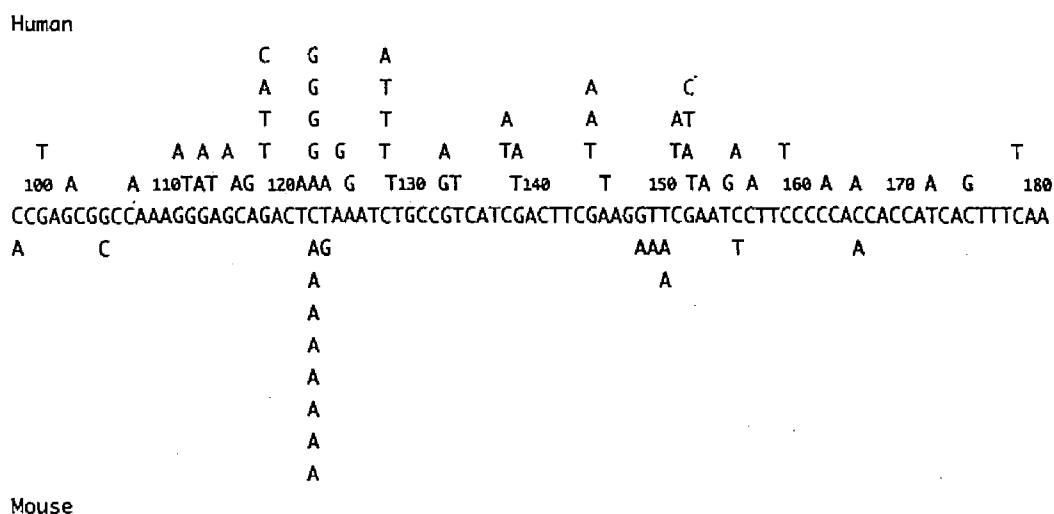


Fig.4-2(A) ヒト細胞WI38-VA13 (上段) およびマウス細胞HL18 (下段) における自然突然変異の突然変異スペクトル

Human

```

      A      T
      A      T
      A      G
      A      G
      A      A
      A      A
      TC A  A      C      T T T T
      G TC G C A      C      A T G TA
      AGA T TC G TC G CC AC AA AT TA A AA GC AAA ATAAA G G A G
      CCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGACTCTAAATCTGCCGTCATCGACTTCGAAGGTTTCGAATCCTTCCCCCACCACCATCACTTTCAA
      AA      AT AT T      C      A T A GAA AT TA G TA
      AT      T      A T A GAA AA TA AT TA
      T      A T GTA AT TT
      T T TTA AT TT
      AG      A      TT
      AG      A      T
      A
      AA
  
```

Mouse

Fig.4-2(B) ヒト細胞WI38-VA13（上段）およびマウス細胞HL18（下段）
におけるp-BQ誘発突然変異の突然変異スペクトル

4.4 考察

p-BQの処理濃度が増加するにつれて、相対コロニー数すなわちプラスミドの生存率は減少しており、p-BQ濃度9.3mMにおいてはバックグラウンドの1.38%程度に減少した（Fig.4-1(A)参照）。相対コロニー数が減少するのは、pMY189がp-BQと反応することによって損傷を受け、それをヒトWI38-VA13細胞が修復できずpMY189が分解されたり、pMY189のプラスミドの複製・維持に不可欠な部分（アンピシリン耐性遺伝子、SV40-T遺伝子、複製起点等）に変異が生じたためである。つまり、この結果からp-BQがシャトルベクターpMY189に致命的な損傷を与えたことがわかる。

一方、突然変異頻度はp-BQの濃度が増加するにつれて増加しており、バックグラウンド（p-BQ濃度0 mM）では 7.8×10^{-4} であった突然変異頻度はp-BQ濃度9.3 mMにおいては 1.4×10^{-2} と約18倍に上昇した（Fig.4-1(B)参照）。突然変異頻度がp-BQ濃度依存的に増加するのは、p-BQ濃度に応じてsupF遺伝子が受ける損傷が多くなり、その損傷の修復ミスが突然変異として固定されるためである。これらの結果からマウスHL18細胞において変異原性を示したp-BQがヒトWI38-VA13細胞においても変異原性を示すことが確認された。

また、ACNプレート上に形成された白色のコロニーから得られた86個の変異supF遺伝子の塩基配列を分析した結果、いずれの場合も最も多いのは塩基対置換で、自然突然変異の73.9%、p-BQによる突

然変異の80.2%を占めているが、自然突然変異では複数の塩基対置換が起こっているもの (multiple) が非常に多く見られたが、*p*-BQによる突然変異では1カ所だけ1塩基対置換が起こっているもの

(single) が多いことや、自然突然変異では*p*-BQによる突然変異には見られない数10~100塩基以上の欠失 (deletion)、挿入 (insertion) が多いのに対し、*p*-BQによる突然変異には1塩基または2塩基の脱落、挿入であるframeshift、特に1塩基の脱落が多く見られること等を確認した。

ヒト、サル、チャイニーズハムスターなど哺乳類の細胞にpZ189系のシャトルベクターを導入すると、自然突然変異におけるdeletionとinsertionの割合が増加することが報告されており[8-10]、自然突然変異でdeletion、insertionが多く見られたのはこれらの報告と一致する。

ヒトWI38-VA13細胞では、*p*-BQによる塩基置換は、G:C塩基対からT:A塩基対への置換が最も多く (37.5%)、次に多いのがG:C塩基対からA:T塩基対への置換 (27.1%) であり、A:T塩基対の置換に比べG:C塩基対の置換ははるかに多かった (87.5%) が、自然突然変異の場合よりもA:T塩基対の置換が多く見られた。*p*-BQはDNAのG、C、A塩基と付加体を形成することが報告されており[11,12]、また、第3章で行ったポリメラーゼストップアッセイの結果でも同様にG、C、A塩基とよく付加体を形成することを確認しており、上記の結果を支持すると考えられる。

また、A塩基またはT塩基への置換 (69.8%) (相補鎖であるため両者の区別はできない) がG塩基またはC塩基への置換 (30.2%) に比べて多く見られるが、これは、DNA修復の際、A塩基を優先的に導入するという法則 (Arule) [13]が働いたためであると思われる。

自然突然変異におけるホットスポットは119、123、129、146、153、154残基目で、これに対して*p*-BQによる突然変異では113、123、146、150、153、158残基目がホットスポットとなっていた (Fig.4-2参照)。両者には123、153残基目のように共通するホットスポットが見られる一方で、113残基目や150残基目のように*p*-BQによる突然変異でのみホットスポットとなっているところもあった。これは自然突然変異とは異なる*p*-BQ特有の突然変異の機構が存在することを示唆している。

第3章で行ったポリメラーゼストップアッセイの結果から、*p*-BQの付加体が多く見られたのはコーディング鎖の94、118、128、139、142、145、148、150残基目と相補鎖の130、131、158、159、162、163残基目であった。*p*-BQによる突然変異のホットスポットと150および158残基目は一致し、また146残基目にも付加体は形成されている。だが、第128、139、162残基などでは多くの付加体が形成されているにも関わらず*p*-BQによる塩基対置換はあまり認められなかった。これはDNAの塩基配列や高次構造がDNA複製やDNA修復の過程に影響を与えるためではないかと考えられる。

また第113、123残基はヒトWI38-VA13細胞におけるクロトンアルデヒドによる突然変異[14]や、同じくヒトWI38-VA13細胞における(±)-7β,8α-dihydroxy-9α,10α-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyreneによる突然変異[9]でもホットスポットとなっている。これらはG残基のN2

およびN7と付加体を形成することが知られており、*p*-BQも同様の付加体を形成することによって突然変異を誘発していると考えることができる。

4.5 マウスHL18細胞との比較考察

第3章ではシャトルベクターpNY200を用いて*p*-BQのマウスHL18細胞における突然変異を解析した。本章では、シャトルベクターをpMY189に、細胞種をヒトWI38-VA13細胞に代えた以外は、これと全く同一系の実験を行ったものである。これらふたつのシャトルベクタープラスミドは、どちらも*supF*遺伝子を突然変異解析の標的として用いるため、第3章の結果と本章で得られた結果を相互に比較することにより、*p*-BQが誘発する突然変異に関してヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞との分子レベルでの種差についての基礎的な情報を得ることができる。

両実験において相対コロニー数は、どちらも同じように*p*-BQの濃度依存的に減少しており、最終濃度（9.26mM）においてはバックグラウンド（*p*-BQ無処理）のときの1%強にまで減少している（Fig.4-1 参照）。

突然変異頻度に関しては、両者にさほど大きな差異は無いように見える（Fig.4-2参照）が、バックグラウンドの突然変異頻度はヒトWI38-VA13細胞のほうが大きいことを考慮する必要がある。マウスHL18細胞では最終濃度（9.3mM）でバックグラウンドの約88倍となった突然変異頻度は、ヒトWI38-VA13細胞では約18倍にしかなくなっておらず、突然変異頻度の上昇率だけを考えると約5倍ほどマウス細胞が大きいことになる。

これは本実験で得られたヒト細胞の自然突然変異頻度が他の実験結果（第5,6章参照）に較べて数倍程度高く表れていることも大きな原因ではあるが、自然突然変異頻度は実験間の差が大きく[14-20]、ばらつきが見られる。

また、この違いには両実験における*p*-BQ処理時の*supF*遺伝子の量的な差が影響を与えている可能性がある。両実験とも*p*-BQで処理をしたシャトルベクタープラスミドの量はそれぞれ9.5 μ gである。だが、pNY200のサイズが約6.1kbであるのに対し、pMY189のサイズは約5.5kbと約1割程度小さい。このため1つの反応チューブ内に存在する*supF*遺伝子数は、pMY189の方が約1割ほど多くなることになり、pNY200に比べると、1つの*supF*遺伝子あたりの*p*-BQ分子の量が少なくなる。すなわち、pMY189上の*supF*遺伝子が受けたDNA損傷はpNY200上の*supF*遺伝子に比べて少ない。このため、ヒトWI38-VA13細胞における突然変異頻度はマウスHL18細胞に比べて低くなったと考えられる。

本研究の結果のみでは、確認された突然変異頻度の相違がヒトとマウスとの種差でを示していると断定することはできない。しかしながら少なくとも、ヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞という細胞種の差が、*p*-BQによる損傷の修復過程に影響したと考えることができる。

また、両実験における突然変異のパターンについても相違が確認できる（Table4-1参照）。マウス

HL18細胞、ヒトWI38-VA13細胞のいずれにおいても自然突然変異でよく見られる数10~100塩基以上のdeletion、insertion（マウスHL18細胞で40.5%、ヒトWI38-VA13細胞では21.7%）がp-BQによる突然変異ではほとんど見られなくなっている（マウスHL18細胞で0%、ヒトWI38-VA13細胞で3.5%）ことは掃相似点であるが、これは、3章でも述べたように哺乳類の細胞にシャトルベクターを導入すると自然突然変異におけるdeletionとinsertionの割合が増加するためであると思われる[8-10]。

注目すべき相違点は、マウスHL18細胞におけるp-BQによる突然変異で多く見られた、連続する2塩基の置換（tandem）が、ヒトWI38-VA13細胞ではあまり見られなかったことである。第3章ではこの連続する2塩基の置換が起こる原因について2点考察している。第1点は、p-BQがDNAと形成したbulky adduct（巨大な付加体）[11]の修復過程で起こるエラーに起因するのではないかという可能性、第2点は高濃度のp-BQで処理しているため、隣り合った2塩基に損傷が生じたため2塩基とも同時に置換されたという可能性である。今回、本実験で塩基配列を調べたpMY189は、第3章で塩基配列を調べたpNY200と同じ濃度（7.4 mM）のp-BQで処理したものである。pMY189はpNY200より若干サイズが小さいものの、隣り合った2塩基に損傷が生じる割合が大きく異なるほどの違いではない。また、突然変異の標的はどちらも同じsupF遺伝子であるので、p-BQがsupF遺伝子と形成する付加体がpMY189とpNY200で大きく異なるとは考えられない。つまり、マウスHL18細胞で見られたタンデム型塩基対置換は、p-BQによる処理の過程で生じた損傷に起因するのではなく、細胞内で修復される過程で生じたものであると考えるのが妥当である。したがって、この結果からもヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とでは、p-BQによって形成されるDNA損傷の修復に何らかの違いがあると考えてよい。

それぞれの塩基置換の内訳にもヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とで差が確認できる（Table 4-2参照）。自然突然変異をヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とで比較すると、マウスHL18細胞ではTransition型の塩基対置換が少ない（10.5%）ことが目立つが、マウスHL18細胞における自然突然変異のデータは母数が少ないため、明確な差であるとは言いがたい。またp-BQが誘発した突然変異を較べると、Transition型塩基置換およびTransversion型塩基置換ともにヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とで有意な差があることが確認された（ $p < 0.05$ Fisher's exact test）。Transition型塩基置換ではG:C塩基対からA:T塩基対への置換が、ヒトWI38-VA13細胞では32.3%であるが、マウスHL18細胞では73.6%と多く見られる。反対にTransversion型塩基置換では、G:C塩基対からT:A塩基対およびG:C塩基対からC:G塩基対が、ヒトWI38-VA13細胞ではそれぞれ37.5%、22.9%、マウスHL18細胞ではそれぞれ18.9%、3.8%となっており、ヒトWI38-VA13細胞で多く見られた。この結果から、ヒト細胞WI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とで、p-BQによるDNA損傷を修復する過程で挿入される塩基に違いがあることが分かる。

マウスHL18細胞およびヒトWI38-VA13細胞のp-BQによる突然変異のスペクトルに関しては、145、150、153、158残基目が共通のホットスポットとなった。また、ヒトWI38-VA13細胞において

最も顕著なホットスポットであった第113、123残基目はマウスHL18細胞では顕著なホットスポットにはなっていない。しかし、第113、123残基目には1個または2個の塩基対置換は起こっており、頻度の大きさに差はあるが、両者の塩基対置換が起こりやすい位置はほぼ一致している。

八木[20]は、変異原としてUVを用いて、シャトルベクターの実験系によりマウスHL18細胞とヒトWI38-VA13細胞で誘発された突然変異の違いについて調べ、UVに対する感受性、突然変異頻度、突然変異スペクトルに加え、タンデム型の突然変異の起こりやすさにも差はないと結論づけており、本研究とは異なる結果になっている。この相違が生じる原因は2つ考えられる。第1点は、マウスHL18細胞の自然突然変異頻度が 3.0×10^{-3} と比較的大きいこと。八木らが研究に用いたマウスHL18細胞用シャトルベクタープラスミドpYZ289[21]が複製に必要な遺伝子を含み、サイズが7.6kbと大きくなっているため、複製の過程におけるエラーが多くなったためと考えられる。第2点はp-BQとUVのDNAへの損傷の与え方の違いである。UVはDNAの塩基対の架橋によるピリミジン二量体というクロスリンク型の損傷を与える[22]が、p-BQがDNAの塩基対を架橋するような形で損傷を与えるという報告はない。ヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞との間にはピリミジン二量体の修復に関して大きな差はないが、p-BQにより形成される付加体の修復に関しては、何らかの差異が存在するという可能性も考えられる。大腸菌の修復酵素exonuclease IIIおよびendonuclease IVでは、ヒトの修復酵素HAP1の10倍の効率でp-BQによる付加体を除去するという報告がなされている[23]。マウスとヒトとの間で、p-BQによるダメージの修復についての種差を、より詳しく検討するためにはさらに研究を進める必要がある。

4.6 まとめ

本章で得られた主要な結果を以下に要約する。

- (1) 第3章でマウスHL18細胞において変異原性が確認されたp-BQは、ヒトWI38-VA13細胞に対しても変異原性を示した。シャトルベクタープラスミドpMY189を9.3mMのp-BQに濃度で処理すると相対コロニー数はバックグラウンドの1.38%にまで減少し、突然変異頻度はバックグラウンド (7.8×10^{-4}) の約18倍の 1.4×10^{-2} に増加した。
- (2) 変異supF遺伝子の塩基配列を調べた結果、p-BQによる誘発突然変異には塩基対置換が多く見られ、その多くがG:C塩基対の置換であった。また、自然突然変異で多く見られた数10~100塩基以上の欠失および挿入はp-BQによる突然変異ではあまり見られなかった。
- (3) 自然突然変異とp-BQが誘発した突然変異のスペクトルとを比較したところ、ホットスポットが一致する位置もあったが、p-BQが誘発した突然変異でのみホットスポットとなっている位置もあり、自然突然変異とは異なるp-BQ特有の突然変異機構の存在を示唆する結果を得た。
- (4) マウスHL18細胞とヒトWI38-VA13細胞の間では、相対コロニー数のp-BQ濃度依存的な減少のし

かたや突然変異のホットスポット位置に大きな差は見られなかったが、突然変異頻度の増加率はヒトWI38-VA13細胞の方が小さいという結果を得た。また、マウスHL18細胞でp-BQが誘発した突然変異で多く見られたタンデム型塩基対置換がヒトWI38-VA13細胞ではあまり見られず、ヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とではp-BQによるDNA損傷の修復に何らかの差異があると考えられた。

参考文献

1. Office of Technology Assessment, *Assessment of technologies for determining cancer risks from the environment*, 1981, Washington D.C., U.S. Government Printing Office.
2. Fox, T.R. and P.G. Watanabe, *Detection of a cellular oncogene in spontaneous liver tumors of B6C3F1 mice*, Science, 1985, **228**(4699), p. 596-7.
3. Environmental Protection Agency, *Guidelines for carcinogen risk assessment. Federal Register 51*, 1986, p. 33992-34002.
4. Peck, C.C., et al., *Opportunities for integration of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development*, Clin Pharmacol Ther, 1992, **51**(4): p. 465-73.
5. Smith, D.A., *Species differences in metabolism and pharmacokinetics: are we close to an understanding?*, Drug Metab Rev, 1991, **23**(3-4), p. 355-73.
6. Goldstein, B.D. and G. Witz, *Benzene*, in *Environmental Toxicants Human Exposure and Their Health Effects*, M. Lippmann (Editor), 1992, Van Nostrand Reinhold, New York, p. 76-97.
7. Girardi, A.J., et al., *SV40-induced transformation of human diploid cells, crisis and recovery*, J. Cell. Comp. Physiol., 1965, **65**, p. 69-84.
8. Calos, M.P., J.S. Lebkowski, and M.R. Botchan, *High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, **80**(10), p. 3015-9.
9. Ashman, C.R. and R.L. Davidson, *High spontaneous mutation frequency in shuttle vector sequences recovered from mammalian cellular DNA*, Mol Cell Biol, 1984, **4**(11), p. 2266-72.
10. Yang, J.L., et al., *Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of (+/-)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene replicates in human cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, **84**(11), p. 3787-91.
11. Hang, B., et al., *An unusual mechanism for the major human apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease involving 5' cleavage of DNA containing a benzene-derived exocyclic adduct in the absence of an AP site*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, **93**(24), p. 13737-41.
12. Singer, B., *DNA damage: chemistry, repair, and mutagenic potential*, Regul Toxicol Pharmacol, 1996, **23**(1 Pt 1), p. 2-13.
13. Sagher, D. and B. Strauss, *Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides*, Biochemistry, 1983, **22**(19), p. 4518-26.
14. Kawanishi, M., et al., *A spectrum of mutations induced by crotonaldehyde in shuttle vector plasmids propagated in human cells*, Carcinogenesis, 1998, **19**(1), p. 69-72.
15. Kawanishi, M., et al., *Mutagenic Specificity of a Derivative of 3-Nitrobenzanthrone in the supF Shuttle Vector Plasmids*, Chemical Research in Toxicology, 1998, **11**(12), p. 1468-1473.
16. Kawanishi, M., et al., *Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids*, Mutat Res, 1998, **417**(2-3), p. 65-73.
17. Matsuda, T., et al., *Molecular analysis of mutations induced by 2-chloroacetaldehyde, the ultimate carcinogenic form of vinyl chloride, in human cells using shuttle vectors*, Carcinogenesis, 1995, **16**(10), p. 2389-94.
18. Matsuda, T., et al., *Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases*, Nucleic Acids Res, 1998, **26**(7), p. 1769-74.
19. Yagi, T., et al., *Analysis of point mutations in an ultraviolet-irradiated shuttle vector plasmid propagated in cells from Japanese xeroderma pigmentosum patients in complementation groups A and F*, Cancer Res, 1991, **51**(12), p. 3177-82.
20. Yagi, T., et al., *Similarity in the molecular profile of mutations induced by UV light in shuttle vector plasmids propagated in mouse and human cells*, Mutagenesis, 1994, **9**(1), p. 73-7.
21. Moriwaki, S., et al., *Analysis of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in a shuttle vector plasmid*

- propagated in mouse O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient cells in comparison with proficient cells*, Cancer Res, 1991, 51(23 Pt 1), p. 6219-23.
22. Williams, J.I. and J.E. Cleaver, *Excision repair of ultraviolet damage in mammalian cells. Evidence for two steps in the excision of pyrimidine dimers*. Biophys J, 1978, 22(2), p. 265-79.
23. Hang, B., et al., *Differential cleavage of oligonucleotides containing the benzene- derived adduct, 1,N6-benzetheno-dA, by the major human AP endonuclease HAP1 and Escherichia coli exonuclease III and endonuclease IV*. Carcinogenesis, 1998, 19(8), p. 1339-43.

5.2 シャトルベクターを用いた突然変異の解析

5.2.1 試薬および細胞

MUCはDr. G.Witz (UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School, USA.) より提供頂いたものを使用した。それ以外の試薬は、特に記載しない限りナカライテスク社製の生化学用試薬または特級試薬を使用した。また、培養細胞および大腸菌株は第4章で使したものと同じものを使用した。

5.2.2 実験手順

シャトルベクタープラスミドpMY189 (9.5 μ g) はTE溶液中でMUCと37℃で1時間混和した。反応液の総体積は500 μ Lである。MUC処理濃度は0, 30, 60, 100 mMの4濃度とした。

シャトルベクタープラスミドpMY189の処理および細胞・大腸菌への導入方法は第3章に記した通りである。

5.3 実験結果

5.3.1 プラスミド回収率と突然変異頻度

ヒト細胞内で複製したプラスミドの生存率を表す相対コロニー数をFig.5-2(A)に、*supF*遺伝子の突然変異頻度をFig.5-2(B)に示す。

これらの結果は実験を3回繰り返して、その平均値と標準偏差とを示した。MUCの濃度が増加するにつれて、プラスミドの回収率を示す相対コロニー数は減少しており、MUCの濃度が100mMのときにはバックグラウンドの5.7%程度にまで減少している。

一方、突然変異頻度はMUCの濃度依存的に増加しており、バックグラウンド (MUC濃度0mM) では 2.0×10^{-4} であった突然変異頻度は、100mMのMUCで処理したことで 5.2×10^{-3} と約25倍に増加している。

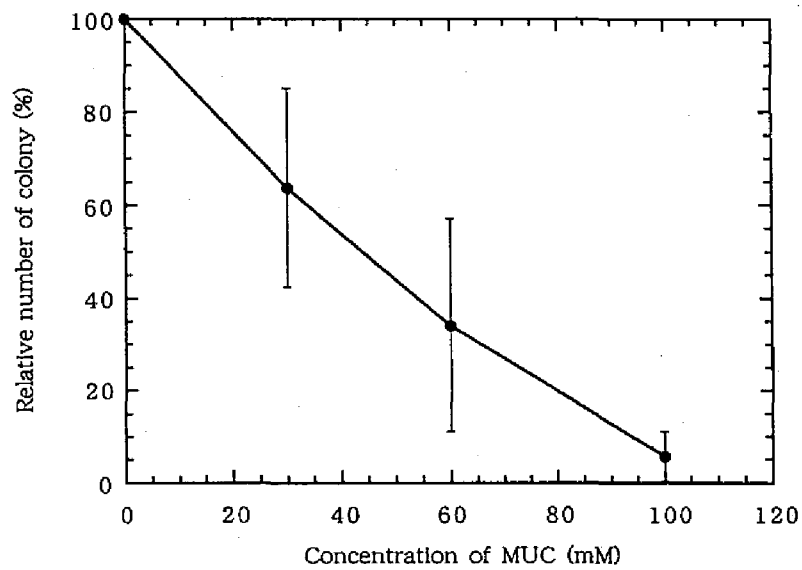


Fig. 5-1 (A) 相対コロニー数

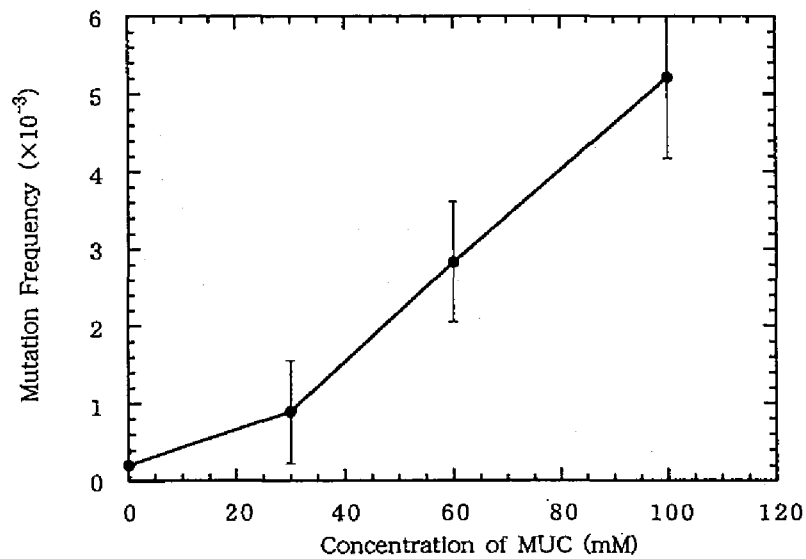


Fig. 5-2 (B) 突然変異頻度

5.3.2 突然変異の内訳

MUCが誘発した変異^{supF}遺伝子の塩基配列を調べた。MUCにより誘発された突然変異のタイプを、自然突然変異とともにTable 5-1に示す。突然変異はBase substitution (塩基対置換)、Frameshift (フレームシフト：翻訳のずれ)、deletion (欠失)、insertion (挿入)、others (その他)の大きく5つのカテゴリーに分類し、塩基対置換はさらに、1塩基置換のsingle、隣あった2塩基が置換する

tandem、数塩基が同時に置換するmultipleの3つに分類した。Table5-1より、自然突然変異、MUC誘発突然変異のいずれの場合も最も多い変異のタイプは塩基置換で、自然突然変異では全体の73.9%、MUCによる突然変異では全体の80.0%を占めていることがわかる。自然突然変異では、塩基対の欠失（deletion）が19.6%と非常に多く見られたが、MUCによる突然変異ではsupF遺伝子上の隣り合った2塩基が同時に置換するtandem base substitutionが多い（13.3%）。また自然突然変異では見られなかったframeshiftも3.3%見られた。

Table 5-1 自然突然変異および
MUC誘発突然変異における突然変異の内訳

Types of mutation	spontaneous		MUC-induced	
	number	%	number	%
Base substitution	34	73.9	48	80.0
single	11	23.9	23	38.3
tandem	1	2.2	8	13.3
multiple	22	47.8	17	28.3
Frameshift	0	0.0	2	3.3
Deletion	9	19.6	2	3.3
Insertion	1	2.2	0	0.0
Others*	2	4.3	8	13.3
Total	46	100.0	60	100.0

*Deletion と塩基対置換の同時誘発

Table5-2には塩基置換の内訳を示した。比較のため、自然突然変異の塩基置換の内訳も併せて示した。DNAを構成する塩基はプリン塩基（グアニン、アデニン）とピリミジン塩基（シトシン、チミン）に分けられる。塩基対置換はTransision（同性塩基置換）型、Transversion（異性塩基置換）型に分類され、全部で6種の塩基変換が可能である。すなわち、2つのTransision（同性塩基置換）型（A:T→G:C, G:C→A:T）と4つのTransversion（異性塩基置換）型（A:T→T:A, A:T→C:G, G:C→C:G, G:C→A:T）である。自然突然変異ではG:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換（同性塩基対置換）が最も多く、全体の39.5%を占めており、次いでG:C塩基対からT:A塩基対へのTransversion型塩の置換が34.6%を占めていた。MUCによる突然変異ではG:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く（29.6%）、次に多いのがG:C塩基対からT:A塩基対への置換であった（22.2%）。

Table 5-2 自然突然変異および
MUC誘発突然変異における突然変異の内訳

Base substitution	spontaneous		MUC-induced	
	number	%	number	%
Transition	32	39.5	34	42.0
G:C to A:T	32	39.5	24	29.6
A:T to G:C	0.0	0	10	12.3
Transversion	49	60.5	47	58.0
G:C to T:A	28	34.6	18	22.2
G:C to C:G	19	23.5	12	14.8
A:T to T:A	0	0.0*	12	14.8*
A:T to C:G	2	2.5	5	6.2
Total	81	100.0	81	100.0

*p<0.05 Fisher's exact testにて有意

5.3.3 突然変異スペクトル

自然突然変異およびMUCによる突然変異のスペクトルをFig.5-3に示す。supF遺伝子の塩基配列の上下に、塩基対置換が起きたサイトおよび置換した塩基を示した。自然突然変異のホットスポットは、119、123、129、146、153、154残基目で、最も顕著なホットスポットは123残基目であった。一方MUCによる突然変異は、ランダムに分散しているものの113、163残基目がホットスポットであった。

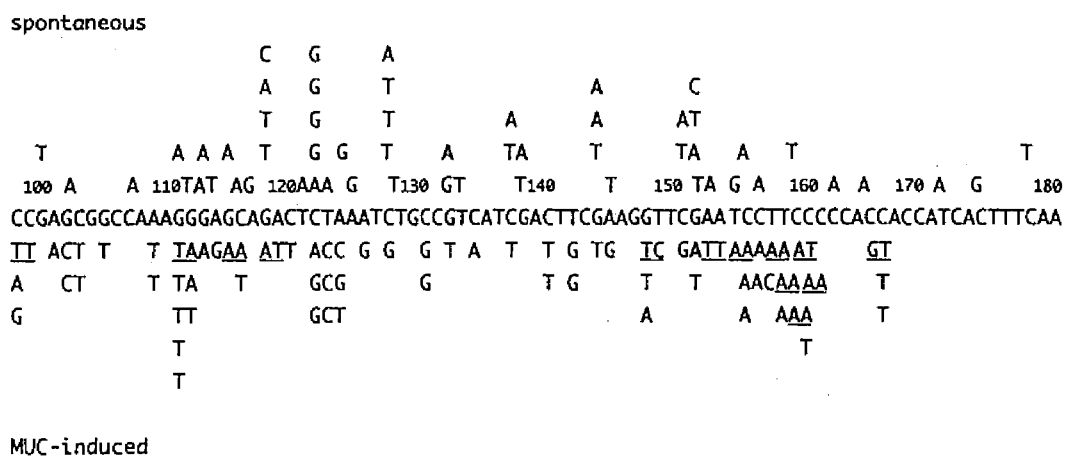


Fig. 5-3 自然突然変異(上段) およびMUC誘発突然変異(下段) による
supF遺伝子の突然変異スペクトル

5.4 考察

相対コロニー数はMUCの濃度依存的に減少しており、MUC濃度100mMにおいてはバックグラウンドの5.7%程度になっている。相対コロニー数が減少するのは、MY189がMUCと反応することによって損傷を受け、それをヒトWI38-VA13細胞が修復できずpMY189が分解されたり、pMY189のプラスミドの複製・維持に不可欠な部分（アンピシリン耐性遺伝子、SV40-T遺伝子、複製起点等）に突然変異が生じたためである。つまり、この結果からMUCがシャトルベクターpMY189に致命的な損傷を与えたことがわかる。

一方、突然変異頻度はMUCの濃度増加とともに上昇しており、バックグラウンド（MUC濃度0 mM）では 2.0×10^{-4} であった突然変異頻度はMUC濃度100mMでは 5.2×10^{-3} と約25倍に増加した。突然変異頻度がp-BQ濃度依存的に増加するのは、MUC濃度に応じてsupF遺伝子が受ける損傷が多くなり、その損傷の修復ミスが突然変異として固定されるためである。これらの結果からMUCは、ヒトWI38-VA13細胞において変異原性を示すことを確認した。

自然突然変異とMUCが誘発した突然変異とについて、突然変異のタイプを比較すると、タンデム型の塩基置換の割合が自然突然変異では2.2%であるのに対し、MUCが誘発した突然変異では13.3%であり、有意な差があることが確認された（Table 5-1 参照）。タンデム型の塩基置換は、DNAの塩基を架橋し、ピリミジンダイマーを生成するUV[8]によっても多く発生することが知られており、本研究で用いたのと同じシャトルベクターpMY189を用いた八木の研究によると16%のタンデム型塩基置換が確認されている[9, 10]。また同じくpMY189を用いて調べたアルデヒド化合物による突然変異では12~18%のタンデム型塩基置換が確認されている[11-14]。

MUCによる突然変異スペクトルはランダムに分散しているが、113,163残基目がホットスポットとして確認された。またタンデム型塩基置換がGG（またはCC）サイトに多く見られるのが、スペクトルの特徴である（Fig.5-3 参照）。Table 5-1ではothersに分類したdeletionやmultipleと同時に誘発されたタンデム型塩基置換も含めてタンデム型塩基置換が誘発された塩基をTable 5-3に示した。Table 5-3より、タンデム型塩基置換のうち41.7%がGGまたはCCサイトに誘発されていることが分かる。アルデヒド化合物であるアセトアルデヒド・アクロレインについては、隣り合ったGG塩基間を架橋することによって、GGまたはCCサイトに特異的にタンデム型塩基置換が起きることが報告されている[11, 13]。アルデヒド基を二つ有するMUCも、上記の2物質と同様にGG間を架橋し、イントラストランド・クロスリンクを形成することによってタンデム型塩基置換が誘発される考えることができる。

Table 5-3 タンデム型塩基対置換の内訳

tandem	number	%
CC or GG site	5	41.7
CC to TT	1	8.3
CC to AA	3	25.0
GG to TA	1	8.3
TT or AA site	2	16.7
TT to AA	1	8.3
AA to TT	1	8.3
GC to AA	1	8.3
GA to AT	1	8.3
GT to TC	1	8.3
TC to AA	1	8.3
CT to AC	1	8.3
total	12	100.0

アルデヒド化合物は反応性が高く、容易にヌクレオチドと反応し、クロスリンクのみでなくモノアダクト（単付加体）をも形成する。すでにアセトアルデヒド、クロトンアルデヒド、アクロレインについては、付加体が同定されている[15-19]。MUCによる塩基置換は、G:C塩基対における置換が全体の66.6%見られ（Table 5-2 参照）、MUCはG:C塩基対に損傷を誘発する率が大いと考えられる。また自然突然変異とMUCが誘発した突然変異に大きな違いはみられないが、A:T塩基対がT:A塩基対に置換する Transversion 型の変異は、自然突然変異とMUCが誘発した突然変異との間で突然変異率に有意な差が確認された（自然:0%、MUC誘発:14.8%、Table 5-2 参照）。MUCは遊離ヌクレオシドであるデオキシグアノシン、デオキシアデノシンとは付加体を形成することがすでに報告されており[20]、MUCがDNAの塩基のグアニンとアデニンに特異的に損傷を与えることにより、G:C及びA:T塩基対において塩基置換が誘発されていると考えられる。

MUCによるsupF遺伝子突然変異スペクトル（Table 5-1, 5-2, Fig. 4-3 参照）は、クロロアセトアルデヒド、アセトアルデヒド、クロトンアルデヒド、アクロレインなどのアルデヒド化合物による突然変異スペクトルと類似している[11-14]。MUCによる突然変異のメカニズムは、全く同じでないにしても他のアルデヒド化合物と同様なメカニズムで突然変異が誘発すると考えることができる。

第4章では、ベンゼン代謝物のうち究極活性体であるp-BQについて突然変異の解析を行った。9.3 mMのp-BQで16時間処理したpMY189のヒトWI38-VA13細胞における突然変異頻度はバックグラウンド（p-BQ濃度0 mM）の 7.8×10^{-4} から 1.4×10^{-2} と約18倍に増加した。100 mMのMUCでpMY189を1

時間処理することによって、突然変異頻度はバックグラウンドの約25倍に上昇している。

処理時間も処理濃度も異なるので、MUCによるpMY189の突然変異頻度とp-BQによる突然変異頻度を単純に相互比較することはできない。しかしAmesテストで確認されるように、MUCの突然変異ポテンシャルが低い[5, 6]とは考えられない。突然変異頻度を誘発するポテンシャルは同程度であると言える。しかしながらMUCが生成量の少ないマイナーな代謝物であることを考えると、生体内でのMUCの変異原性は強くはないと考えられる。

本研究ではMUCのみの変異原性について調べたが、赤血球形成に対するベンゼン代謝物の複合的な影響を調べたSnyderによると、p-BQの前駆体であるハイドロキノンとMUCとのコンビネーションが赤血球の形成を最も強く抑制することが報告されている[21]。ベンゼンによる白血病の誘発には、単一の代謝物の影響ではなく複合影響であることは十分に考えられる。MUCについても、他の代謝物の存在下で、変異原ポテンシャルが変化する可能性についても検討する必要がある。

5.5 まとめ

本章で得られた主要な結果を以下に要約する。

- (1) ヒトWI38-VA13細胞においてMUCが変異原性を示すことを確認した。シャトルベクタープラスミドpMY189を100mMのMUCで処理すると相対コロニー数はバックグラウンドの5.7%程度に減少し、突然変異頻度はバックグラウンド（MUC濃度0mM）の 2.0×10^{-4} から 5.2×10^{-3} と約25倍に増加している。
- (2) 自然突然変とMUCが誘発した突然変異の変異型を調べたところ、タンデム型の塩基置換の割合が自然突然変異では2.2%であるのに対し、MUCが誘発した突然変異では13.3%あり、有意な差があると確認された。
- (3) タンデム型塩基置換のうち41.7%がGGまたはCCサイトに誘発されていた。これは隣り合ったGG塩基間を架橋するためであると考えられる。
- (4) G:C塩基対における塩基置換が塩基置換全体の66.6%見られ、MUCはG:C塩基対に損傷を誘発する率が高いと考えられる。また自然突然変異とMUCが誘発した突然変異で、A:T塩基対がT:A塩基対に置換するTransversion型の変異の誘発率に有意な差が確認された（自然：0%、MUC誘発：14.8%）。これらの結果は、MUCが遊離ヌクレオシドであるデオキシグアノシン、デオキシアデノシンと付加体を形成するという報告と一致する。
- (5) MUCによる突然変異スペクトルは、クロロアセトアルデヒド、アセトアルデヒド、クロトンアルデヒド、アクロレインによる突然変異スペクトルと類似しており、アルデヒド化合物に特異的なメカニズムで突然変異が誘発すると考えることができる。

参考文献

1. Parke, D. and R. Williams, *Studies in detoxification. 44. The metabolism of benzene containing 14C-benzene*, Biochem J, 1953, **54**, p. 231-238.
2. Witz, G., *et al.*, *Reactive ring-opened aldehyde metabolites in benzene hematotoxicity*, Environ Health Perspect, 1996, **104 Suppl 6**, p. 1195-9.
3. 神奈川県化学物質安全情報提供システム, <http://www.kerc.pref.kanagawa.jp/kisnet>.
4. Witz, G., *et al.*, *Short-term toxicity of trans,trans-muconaldehyde*, Toxicol Appl Pharmacol, 1985, **80**(3), p. 511-6.
5. Snyder, R., *et al.*, *The toxicology of benzene*, Environ Health Perspect, 1993, **100**, p. 293-306.
6. Glatt, H. and G. Witz, *Studies on the induction of gene mutations in bacterial and mammalian cells by the ring-opened benzene metabolites trans,trans-muconaldehyde and trans,trans-muconic acid*, Mutagenesis, 1990, **5**(3), p. 263-6.
7. Ho, T.Y. and G. Witz, *Increased gene expression in human promyeloid leukemia cells exposed to trans,trans-muconaldehyde, a hematotoxic benzene metabolite*, Carcinogenesis, 1997, **18**(4), p. 739-44.
8. Williams, J.I. and J.E. Cleaver, *Excision repair of ultraviolet damage in mammalian cells, Evidence for two steps in the excision of pyrimidine dimers*, Biophys J, 1978, **22**(2), p. 265-79.
9. Yagi, T., *et al.*, *Analysis of point mutations in an ultraviolet-irradiated shuttle vector plasmid propagated in cells from Japanese xeroderma pigmentosum patients in complementation groups A and F*, Cancer Res, 1991, **51**(12), p. 3177-82.
10. Yagi, T., *et al.*, *Similarity in the molecular profile of mutations induced by UV light in shuttle vector plasmids propagated in mouse and human cells*, Mutagenesis, 1994, **9**(1), p. 73-7.
11. Matsuda, T., *et al.*, *Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases*, Nucleic Acids Res, 1998, **26**(7), p. 1769-74.
12. Matsuda, T., *et al.*, *Molecular analysis of mutations induced by 2-chloroacetaldehyde, the ultimate carcinogenic form of vinyl chloride, in human cells using shuttle vectors*, Carcinogenesis, 1995, **16**(10), p. 2389-94.
13. Kawanishi, M., *et al.*, *Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids*, Mutat Res, 1998, **417**(2-3), p. 65-73.
14. Kawanishi, M., *et al.*, *A spectrum of mutations induced by crotonaldehyde in shuttle vector plasmids propagated in human cells*, Carcinogenesis, 1998, **19**(1), p. 69-72.
15. Vaca, C.E., *et al.*, *Formation of DNA adducts in human buccal epithelial cells exposed to acetaldehyde and methylglyoxal in vitro*, Chem Biol Interact, 1998, **108**(3), p. 197-208.
16. Nath, R.G., *et al.*, *A 32P-postlabeling method for simultaneous detection and quantification of exocyclic etheno and propeno adducts in DNA*, Carcinogenesis, 1994, **15**(5), p. 979-84.
17. Khullar, S., *et al.*, *Postsynthetic generation of a major acrolein adduct of 2'- deoxyguanosine in oligomeric DNA*, J Med Chem, 1999, **42**(6), p. 947-50.
18. Hakala, K., *et al.*, *Mass spectrometric (HPLC/ESI-MS/MS) quantification of pyrimido[1,3- a]purin-10(3H)-one, a guanine adduct formed by reaction of malondialdehyde with DNA*, J Pharm Biomed Anal, 1999, **21**(5), p. 1053-61.
19. Fang, J.L. and C.E. Vaca, *Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers*, Carcinogenesis, 1997, **18**(4), p. 627-32.
20. Bleasdale, C., *et al.*, *Chemistry of muconaldehydes of possible relevance to the toxicology of benzene*, Environ Health Perspect, 1996, **104 Suppl 6**, p. 1201-9.
21. Snyder, R., *et al.*, *Studies on the mechanism of benzene toxicity*, Environ Health Perspect, 1989, **82**, p. 31-5.

第6章 ベンゼン代謝生成物ハイドロキノンによる突然変異の解析

6.1 はじめに

ハイドロキノン (Hydroquinone : 以下、HQ) は、写真感光材料、染料、化学合成原料に用いられている。また皮膚の色素沈着改善に効果があり、医薬品や化粧品にも使用されており、アメリカでは成分の4%にHQを含む化粧品 (Medics) が市販されている (Fig 6-1 参照)。



Fig.6-1 Hydroquinoneを4%含む化粧品

しかし、HQはベンゼンの主要な代謝物であるフェノールの酸化により生成し、ベンゼンの毒性に関与する物質である[1] (Fig1-3参照)。ベンゼンを摂取した動物の骨髓中にはHQが残存し、骨髓細胞を著しく減少させることが知られている[1]。またHQは、DNA合成阻害試験、不定期DNA合成試験、小核試験、Ames試験 (-S9)、姉妹染色分体交換試験で陽性と報告されている[2]。動物実験では催新生物性も報告されており、ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 米国産業衛生専門家会議)は発癌性評価をA3「動物実験で発がん性が認められた物質」に分類している。ただしIARCはヒトに対する発がん性評価をGroup3「発がん性の疑わしい物質」に分類している。

ベンゼンが毒性を発現する機構には、代謝物自体だけでなく、代謝物から生成する活性酸素種も大きな役割を果たしていると考えられている[3, 4]。Hirakuらは、HQ, *p*-BQによる活性酸素種の生成とDNA鎖切断を確認し、両物質間の酸化還元サイクルモデル (Fig. 6-2 参照) を提示した[5]。彼らが提示するHQ⇌*p*-BQ酸化還元サイクルモデルでは、生体内の酵素であるNADHが還元剤として、2価の銅イオンが酸化剤として重要な働きをするが、NADHはエネルギー代謝に、そして銅は染色体のクロマチン構造形成に関与する、生体に重要な物質である。

本章では、Hirakuらが提示したHQ⇌*p*-BQ酸化還元サイクルモデルを参考に、シャトルベクターpMY189を用いてベンゼン代謝物による活性酸素種が誘発する突然変異の解析を行うことを目的とする。

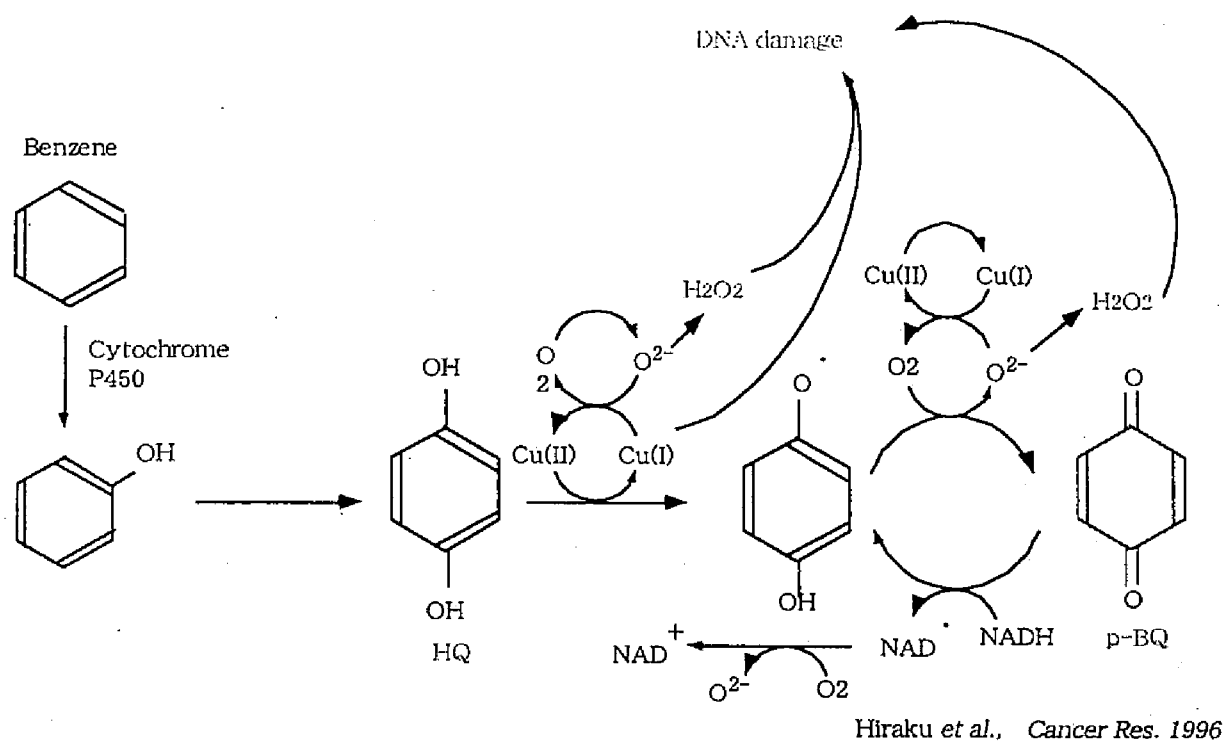


Fig. 6-2 HQの酸化還元サイクルによるDNA損傷

6.2 シャトルベクターを用いた突然変異の解析

6.2.1 試薬および細胞

試薬は、特に記載のない限りナカライテスク社製の生化学用試薬または特級試薬を使用した。また、培養細胞および大腸菌株は第4章で使したものと同じものを使用した。

6.2.2 実験手順

シャトルベクタープラスミドpMY189 (9.5μg) はTE溶液中でHQと37℃で1時間混和した。反応液の総体積は500μlである。

まずシャトルベクタープラスミドpMY189をHQのみと反応させたものと、NADH (250μM) およびCuCl₂ (20μM) の存在下でHQと反応させたものについて、DNA鎖の切断状況を確認した。

突然変異の解析は、NADH (250μM) およびCuCl₂ (20μM) 共存下でHQ処理したものについて行った。以下、NADHおよびCu(II)共存下におけるHQによる処理をHQの単独処理と区別して、HQ酸化還元処理と呼ぶ。HQ処理濃度は0, 50, 100, 150 μMの4濃度とした。シャトルベクタープラスミドpMY189の細胞・大腸菌への導入方法は第3章に記した通りである。

6.3 実験結果

6.3.1 DNA鎖の切断

シャトルベクタープラスミドpMY189をHQのみで処理したものと、HQ酸化還元処理したものについて、DNA鎖の切断状況を電気泳動で確認した。Fig6-3に電気泳動写真を示す。

無処理のpMY189を泳動させたLane1では、2本のバンドが確認できる。下方に確認できる太いバンドはスーパーコイル（超らせん）型のプラスミドの存在を示すバンドであり、上方に確認できるバンドはオープンサーキュラー（開環）型のプラスミドの存在を示すバンドである。Lane2-6はHQ酸化還元処理したプラスミドの泳動Laneである。HQの処理濃度が0mMのとき（Lane2）は、わずかにオープン型のプラスミドのバンドが確認できるが、HQ濃度の増加によりオープン型プラスミドのバンドが濃くなる傾向が確認できた（Lane3,4）。HQ濃度が0.1mMではスーパーコイル型のプラスミドは無くなり、全てオープン型になった。さらにHQ濃度を1,10mMに増加させると、バンドはスメアになり、プラスミドのフラグメンテーション（断片化）が確認できた（Lane5,6）。またLane7-10にはHQ単独で処理したpMY189を泳動した。HQ単独処理では、濃度10,50mMで、オープン型のプラスミドがわずかに増加している（Lane9,10）ものの、HQ酸化還元により見られたようなDNA鎖のフラグメンテーションは確認できなかった。HQは単独で存在するよりも、酸化剤および還元剤共存下にて存在するほうが、より低濃度にて影響が生じることが分かる。したがって、以下では突然変異の解析はHQ酸化還元処理にて行った。

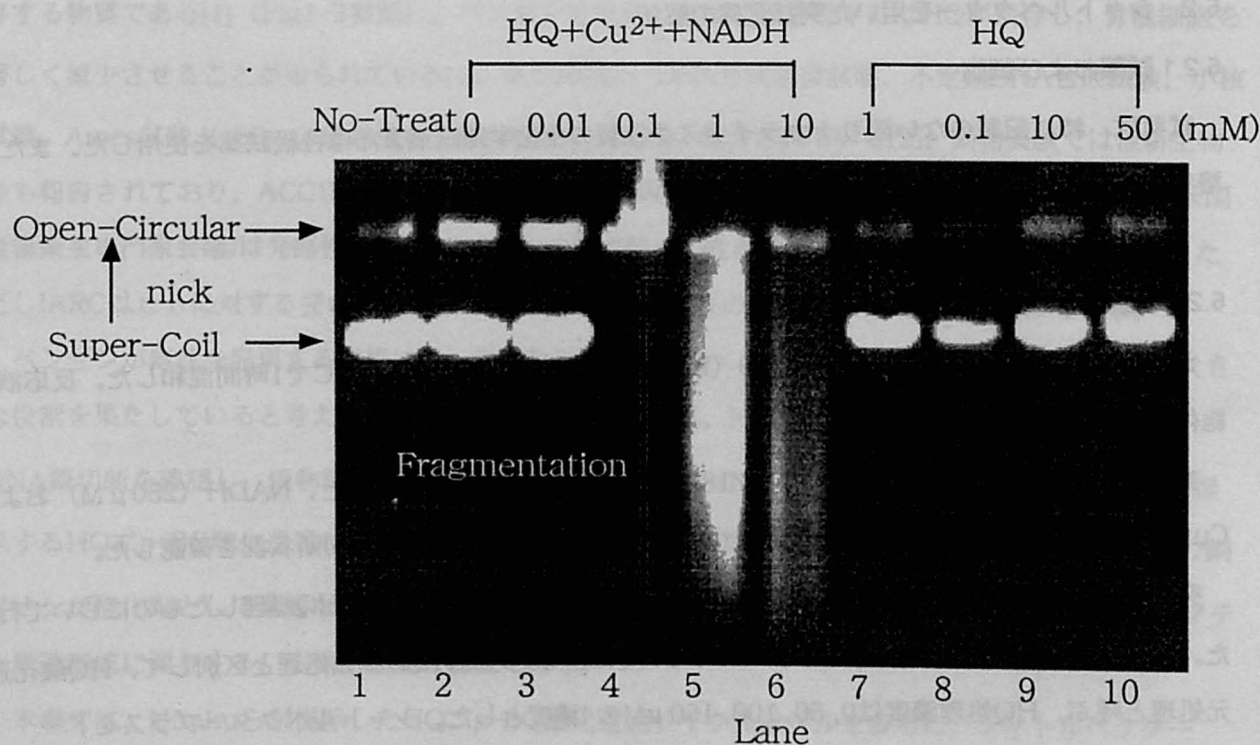


Fig. 6-3 HQによるDNA鎖切断

6.3.2 プラスミド回収率と突然変異頻度

ヒト細胞内で複製したプラスミドの生存率を表す相対コロニー数をFig.6-4(A)に、*supF*遺伝子の突然変異頻度をFig.6-4(B)に示す。これらの結果は実験を3回繰り返し、その平均値と標準偏差とを示した。

HQの濃度が増加するにつれ、プラスミドの回収率を表す相対コロニー数は減少しており、HQの濃度が100mMのときにはバックグラウンドの18.3%程度にまで減少している。一方、突然変異頻度はHQの濃度依存的に増加しており、バックグラウンド（HQ濃度0 μ M）では 2.1×10^{-4} であった突然変異頻度は、100 mMのHQで処理したことで 4.9×10^{-3} と約23倍に増加している。

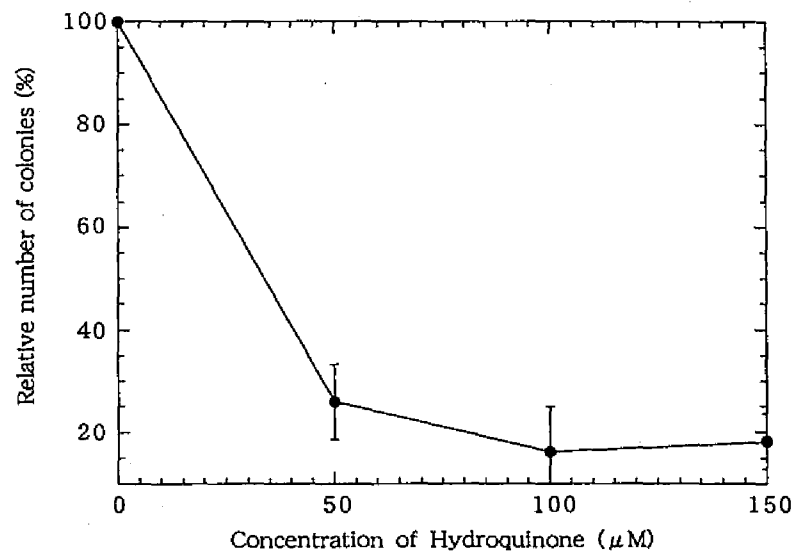


Fig. 6-1 (A) 相対コロニー数

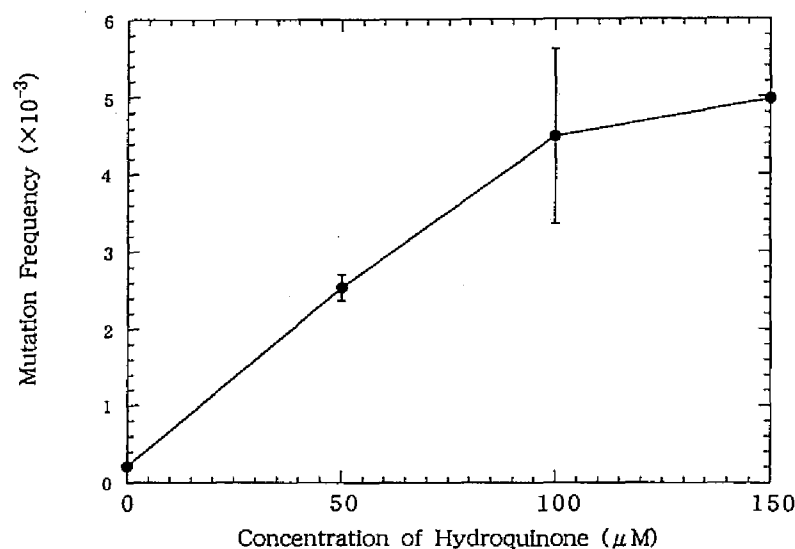


Fig. 6-2 (B) 突然変異頻度

6.3.3 突然変異の内訳

HQ酸化還元処理により誘発された変異^{supF}遺伝子の塩基配列を調べた。誘発された突然変異のタイプを、自然突然変異とともにTable 6-1に示す。

突然変異はBase substitution (塩基対置換)、Frameshift (フレームシフト：翻訳のずれ)、deletion (欠失)、insertion (挿入)、others (その他)の大きく5つのカテゴリーに分類し、塩基対置換はさらに、1塩基置換のsingle、隣あった2塩基が置換するtandem、数塩基が同時に置換するmultipleの3つに分類した。

Table 6-1より、HQ酸化還元処理突然変異のうち最も多い変異のタイプは欠失であり、自然突然変異で欠失が占める割合は全体の19.6%であるのに対し、HQによる突然変異では全体の42.4%を占めていることがわかる。次いで、HQ酸化還元処理突然変異では塩基対置換が全体の47.0%を占めている。自然突然変異では塩基対置換が全体の73.9%と最も多い変異型であった。

また^{supF}遺伝子から欠失したDNAサイズおよび領域をそれぞれTable 6-2, Fig 6-5に示す。欠失サイズは41b以上のものが全体の70%を占めている。また欠失の約50%は1~3b程度の短い繰り返し配列に挟まれたところで起きるslippagemispairingであった。これをFig 6-6に示す。

Table 6-1 自然突然変異およびHQ誘発突然変異の内訳

Types of mutation	spontaneous		HQ-induced	
	number	%	number	%
Base substitution	34	73.9	31	47.0
single	11	23.9	17	25.8
tandem	1	2.2	0	0.0
multiple	22	47.8	14	21.2
Frameshift	0	0.0	0	0.0
Deletion	9	19.6	28 **	42.4
Insertion	1	2.2	1	1.5
Others*	2	4.3	6	9.1
Total	46	100.0	66	100.0

*Deletionと塩基対置換が同時に誘発されたもの

** Fisher's exact test $p < 0.05$ で有意

Table 6-2 欠失サイズ

Deletion Size	number	%
0-20	4	12.5
21-40	4	12.5
41-	24	75.0
Total	32	100.0

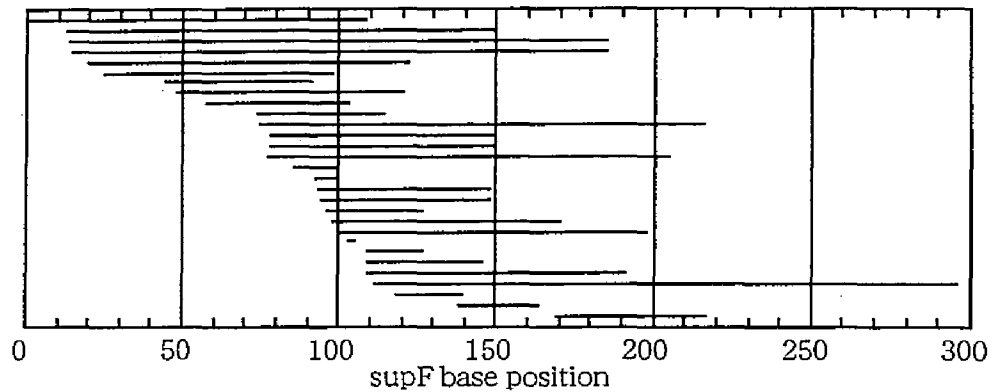


Fig. 6-5 HQにより *supF* 遺伝子から欠失した領域

13-150	94-148
ACTTTTACA-----AAGGTTTCGA	TGGGGTTTCCGA-----CGAAGGTTTGAA
20-122	95-148
CACCTGGCG-----GACTCTTAA	GGGGTTTCC-----CGAAGGTT
25-98	98-170
GCCCGTCA-----TTCCCGA	GTTCCCGAG-----ACCACTATC
74-216	112-296
AGTTAAAGCA-----TAGAAAGAT AAA	AAAGGGAG-----CCAGCGGT
78-149	120-140
AAAGCATT-----CATCCACT	CAGACTCT-----ATCCACTT
77-205	109-126
AAAAGCATT-----GTCAGCCC	GCCAAAGG-----CTAAATCT
84-98	93-100
TTACCTGTG-----GTTCCCGAG	TGGGGTTCCCGAGC

Fig. 6-6 slippage mispairingによる欠失部位

Table6-3には塩基置換の内訳を示した。比較のため、自然突然変異の塩基置換の内訳も併せて示した。HQの酸化還元が誘発突然変異と自然突然変異とを較べると、誘発された塩基対置換の割合が両者ともに極めてよく似ていることがわかる。HQ誘発突然変異および自然突然変異ともにそれぞれG:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換（同性塩基対置換）が最も多く、全体の39.5%、33.9%を、次いでG:C塩基対からT:A塩基対へのTransversion型の置換がそれぞれ34.6%、27.4%を占めていた。またHQ酸化還元誘発および自然誘発、両変異ともにA:T塩基対における塩基置換が少なく、それぞれ全体の2.5%、12.9%であった。

Table 6-3 自然突然変異および
HQ誘発突然変異における塩基対置換の内訳

Base substitution	spontaneous		HQ-induced	
	number	%	number	%
Transition	32	39.5	25	40.3
G:C to A:T	32	39.5	21	33.9
A:T to G:C	0.0	0	4	6.5
Transversion	49	60.5	37	59.7
G:C to T:A	28	34.6	17	27.4
G:C to C:G	19	23.5	16	25.8
A:T to T:A	0	0.0*	3	4.8
A:T to C:G	2	2.5	1	1.6
Total	81	100.0	62	100.0

6.3.4 突然変異スペクトル

自然突然変異およびHQによる突然変異のスペクトルをFig.6-7に示す。*supF*遺伝子の塩基配列の上下に、塩基対置換が起きたサイトおよび置換した塩基を示した。塩基対置換のスペクトルは、自然突然変異とHQ誘発突然変異とで比較的類似している。両者の突然変異ホットスポットは、123残基目であった。

自然突然変異とHQ酸化還元誘発突然変異とについて、突然変異のタイプを比較すると、HQ酸化還元誘発突然変異では欠失が全体の42.4%（自然突然変異では全体の19.6%）を占めていることが特徴的であることが分かる（Table6-1参照）。欠失したDNAサイズは41b以上の欠失が全体の75%を占めている（Table6-2参照）。シャトルベクターを用いて、アルデヒド[6-9]、アルキル化剤[10, 11]、多環芳香族[12]およびp-BQが誘発する突然変異を解析した結果によると、主要な突然変異型は塩基対置換である。しかし欠失を多く誘発する数少ない変異原として、過酸化水素が報告されている[13]。過酸化水素は、Hirakuらの提示するHQ⇌p-BQ酸化還元サイクル（Fig. 6-2 参照）で生成する活性酸素種の一つであり、本実験において確認した欠失の誘発にも関与していると考えられる。

また本研究における自然およびHQ酸化還元誘発塩基置換は互いによく似ており、Moraesらが報告した自然およびH₂O₂誘発塩基置換のタイプとも非常によく似ている[13]ことがわかる。HQ誘発突然変異および自然突然変異ともにそれぞれG:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換（同姓塩基対置換）が最も多く、全体の39.5%、33.9%を、次いでG:C塩基対からT:A塩基対へのTransversion型の置換がそれぞれ34.6%、27.4%、A:T塩基対における塩基置換は両者ともに少なく、それぞれ全体の2.5%、12.9%であった（Table 6-3 参照）。H₂O₂が誘発した塩基置換は、G:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換（同姓塩基対置換）が最も多く58%、次いでG:C塩基対からC:G塩基対への置換が20%、G:C塩基対からT:A塩基対への置換が19%であり、A:T塩基対での塩基置換が数%である[13]。また、自然突然変異およびHQ酸化還元誘発突然変異のスペクトルも互いによく似ていた（Fig.6-7参照）。

自然突然変異およびHQ酸化還元誘発突然変異、H₂O₂誘発突然変異の変異型は互いによく似ている。これは3者の変異が同じ機構で誘発されたことを示唆している。過酸化水素のような活性酸素種は、突然変異の外的因子であるばかりでなく、細胞内で自然に発生する内的因子でもある。またHQの酸化還元サイクル（Fig.6-2 参照）においてH₂O₂の発生が確認されている。すなわち自然突然変異およびHQ酸化還元処理突然変異の因子はH₂O₂であると考えることが出来る。

DNAの複製時にはslippage mispairing というエラーが起こることが知られている[14, 15]。DNA複製の際、1～3塩基程度の短いリピート配列間で、DNAの1本鎖が誤ってずれて他方の鎖と対合し、ずれた塩基がループを生じ、そのループが解消されずに欠失変異が起きるのである。HQ酸化還元処理欠失のうち50%には、欠失サイトの両端に1～3塩基程度の短いリピート配列が見られ（Fig.6-6参照）、slippage mispairing によると思われる欠失が起きていると考えられる。異らは、制限酵素でDNAの2本鎖を切断してリニアライズしたプラスミドを細胞に導入、突然変異の解析を行っているが、これによると欠失は多い変異型ではないことが分かっている[16]。従って、本実験における欠失には、DNAの2本鎖切断ではなく、過酸化水素がDNAの塩基に与えた酸化的ダメージの修復過程が関与していると考えするのが妥当である。

Hiraku[5]らは、HQの酸化還元により、特に5'-GTG-3'配列のTに付加体が生成すると報告しているが、本研究では塩基置換も欠失のブレイクポイントもA:Tサイトにはほとんど見られず、Tにダメージが生じたとしても突然変異は誘発されていない。紫外線などは、A:Tサイトで高頻度にDNA損傷が生じるが、突然変異が多く誘導されるのはG:Cサイトである[17-19]。これは、塩基によってダメージの修復効率が異なるためであると思われる。実際、塩基損傷の修復においてA塩基が優先的に導入される法則、「A rule」が確認されている[20, 21]。

Big Blueマウスは、*vivo*突然変異試験系として開発され、全細胞にlacI遺伝子を有しており、これを臓器から抽出、解析することで多臓器で突然変異を調べることができる。BigBlueマウスから得られた突然変異スペクトルはデータベース化されており、現在23物質が誘発した突然変異についてデータを得ることができる[22]。このデータベースにより、ベンゼンが誘発した突然変異の約20%は欠失であることが分かる。欠失の割合が10%を越える変異原は、ベンゼンの他にはDMN（ジメチルニトロソアミン）と γ 線のみであり、その他の物質が誘発する主要な変異は塩基置換であった。

本実験のような*vitro*試験系だけでなく、*vivo*試験系でも、ベンゼンは高頻度に欠失を誘発している。非常に興味深い結果である。ベンゼンはヒトの白血病原とされているが、白血病の細胞では、DNA鎖の切断に起因すると考えられる染色体異常が多く観察されている。しかし本研究の結果から直ちに、*supF*遺伝子に欠失を誘発したベンゼン代謝物HQの酸化還元反応が、白血病に特有の染色体異常をも誘発すると短絡的に考えることはできない。しかし、第3章で調べたような*p*-BQが点突然変異を誘発する機構よりも、HQの酸化還元反応がベンゼンによる発がん機構により深く関与していると推察される。ベンゼンによる発がんリスクを評価するためには、ベンゼン代謝物そのものの生成だけでなく、そこから発生する活性酸素種の影響を考慮する必要がある。

6.5 まとめ

本章で得られた主要な結果を以下に要約する。

- (1)HQはNADHおよびCu(II)存在下で、DNA鎖を切断し、さらにヒトWI38-VA13細胞において変異原性を示すことを確認した。シャトルベクタープラスミドpMY189をNADHおよびCu(II)共存下でHQ（100mM）で処理すると、相対コロニー数はバックグラウンドの18.3%程度に減少し、突然変異頻度はバックグラウンド（HQ濃度0 μ M）の 2.1×10^{-4} から 4.9×10^{-3} と約23倍に増加した。
- (2)HQ酸化還元処理突然変異のうち最も多い変異のタイプは欠失で、自然突然変異では全体の19.6%しかないのに対し、HQの酸化還元による突然変異では全体の42.4%を占めており、有意な差を確認した。また*supF*遺伝子から欠失したDNAは41b以上のものが全体の75%を占めていた。また、その50%がslippagemisparingによると考えられる欠失であった。
- (3)HQ酸化還元処理突然変異と自然突然変異とでは、塩基対置換のタイプが極めてよく似ていた。HQ

酸化還元処理突然変異および自然突然変異ともにそれぞれG:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換（同性塩基対置換）が最も多く、全体の39.5%、33.9%を、次いでG:C塩基対からT:A塩基対へのTransversion型塩の置換がそれぞれ34.6%、27.4%を占めていた。またHQ酸化還元処理誘発および自然誘発、両変異ともにA:T塩基対における塩基置換が少なく、それぞれ全体の2.5%、12.9%であった。またH₂O₂誘発突然変異の塩基対置換のタイプともよく似ており、自然突然変異およびHQ酸化還元処理誘発突然変異の塩基置換はH₂O₂により誘発される塩基置換と同じ機構で誘発されていると考えられる。

- (4)自然突然変異およびHQ酸化還元処理誘発突然変異のスペクトルを調べたところ、自然突然変異とHQ酸化還元処理誘発突然変異とで比較的類似していた。両者の突然変異ホットスポットは、123残基目であった。

参考文献

1. Goldstein, B.D. and G. Witz, *Benzene, in Environmental Toxicants Human Exposure and Their Health Effects*, M. Lippmann (Editor), 1992, Van Nostrand Reinhold, New York, p. 76-97.
2. 神奈川県化学物質安全情報提供システム, <http://www.kerc.pref.kanagawa.jp/kisnet>.
3. Kolachana, P., et al., *Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo*, *Cancer Res*, 1993, 53(5), p. 1023-6.
4. Subrahmanyam, V.V., et al., *Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukemia*, *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(5), p. 495-515.
5. Hiraku, Y. and S. Kawanishi, *Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites*, *Cancer Res*, 1996, 56(22), p. 5172-8.
6. Kawanishi, M., et al., *Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids*, *Mutat Res*, 1998, 417(2-3), p. 65-73.
7. Kawanishi, M., et al., *A spectrum of mutations induced by crotonaldehyde in shuttle vector plasmids propagated in human cells*, *Carcinogenesis*, 1998, 19(1), p. 69-72.
8. Matsuda, T., et al., *Molecular analysis of mutations induced by 2-chloroacetaldehyde, the ultimate carcinogenic form of vinyl chloride, in human cells using shuttle vectors*, *Carcinogenesis*, 1995, 16(10), p. 2389-94.
9. Matsuda, T., et al., *Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases*, *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(7), p. 1769-74.
10. Moriwaki, S., et al., *Analysis of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in a shuttle vector plasmid propagated in mouse O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient cells in comparison with proficient cells*, *Cancer Res*, 1991, 51(23 Pt 1), p. 6219-23.
11. Murata Kamiya, N., et al., *Glyoxal, a major product of DNA oxidation, induces mutations at G:C sites on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells*, *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(10), p. 1897-902.
12. Kawanishi, M., et al., *Mutagenic Specificity of a Derivative of 3-Nitrobenzanthrone in the supF Shuttle Vector Plasmids*, *Chemical Research in Toxicology*, 1998, 11(12), p. 1468-1473.
13. Moraes, E.C., S.M. Keyse, and R.M. Tyrrell, *Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis*, *Carcinogenesis*, 1990, 11(2), p. 283-93.
14. Ikehata, H., et al., *Shuttle vector system for the analysis of mutational events in mammalian chromosomal DNA*, *Mutat Res*, 1989, 210(2), p. 237-47.
15. Ikehata, H., et al., *Spectrum of spontaneous mutations in a cDNA of the human hprt gene integrated in chromosomal DNA*, *Mol Gen Genet*, 1989, 219(3), p. 349-58.
16. Tatsumi-Miyajima, J., et al., *Analysis of mutations caused by DNA double-strand breaks produced by a restriction enzyme in shuttle vector plasmids propagated in ataxia telangiectasia cells*, *Mutat Res*, 1993, 294(3), p. 317-23.
17. Nishigori, C., et al., *Mutations in ras genes in cells cultured from mouse skin tumors induced by ultraviolet*

- irradiation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(15), p. 7189-93.
18. Yagi, T., *et al.*, *Analysis of point mutations in an ultraviolet-irradiated shuttle vector plasmid propagated in cells from Japanese xeroderma pigmentosum patients in complementation groups A and F*, Cancer Res, 1991, 51(12), p. 3177-82.
 19. Yagi, T., *et al.*, *Similarity in the molecular profile of mutations induced by UV light in shuttle vector plasmids propagated in mouse and human cells*, Mutagenesis, 1994, 9(1), p. 73-7.
 20. Drake, J.W., *Properties of ultraviolet induced rII mutations of bacteriophage T4*, J.Mol.Biol., 1963, 6, p. 268-283.
 21. Tesman, I., *A mutation of UV-reactivation*. Abstract of the Bacteriophage meeting, E.L. A.I. Bukhari (Editor), 87, 1976, NY, Cold Spring Harbor
 22. Boer, J.d., *The Big Blue Website*, <http://eden.ceb.uvic.ca/bigblue.htm>

第7章 ベンゼン代謝生成物による突然変異への寄与

7.1 はじめに

代謝とは、組織内で起こる化学または物理学的反応を言う。代謝は、生物が生きていくために必須の物質を作り出す上で非常に重要であるが、外因性の化学物質の解毒システムとしても重要である。しかし、時として生体に有害な物質が、代謝により生成することがある。ベンゼンの場合が、まさにこれに当てはまる。生物の体内にベンゼンが吸収されると、体内に吸収されたベンゼンの43%は、代謝されずベンゼンのまま排出され、5~10%は脂肪や臓器に蓄積される。解毒システムとしての代謝反応は、残りのベンゼンを様々な物質に変換していく。その過程で、生物の遺伝情報であるDNAと高い反応性を持つ物質が生成するのである (Fig.1-3参照)。ベンゼンの代謝物は種々生成するが、もっとも主要な代謝物は、フェノールである。フェノールは、さらに代謝を受け、カテコールやハイドロキノンを生産する。ハイドロキノンは、さらに酸化されてパラベンゾキノンを生産する。尿中に排出された代謝生成物の23%は、フェノールとして、4.8%はハイドロキノン、2.2%はカテコール、1~2%はムコンアルデヒドがさらに酸化されたムコニックアシッドとして排出される。

ベンゼンにより白血病が誘発されることは、過去の疫学調査などから明らかである。ベンゼンの発がん機構については、これまで数多くの研究がなされており、代謝生成物が発がんの引き金を引く、すなわち突然変異を誘発するということは確認されている。本研究では、代謝物のうちでも毒性が強いとされるパラベンゾキノン (*p*-BQ)、ムコンアルデヒド (MUC)、ハイドロキノン (HQ)について、突然変異スペクトルを調べた。本章では、これらのスペクトルおよびDose-Responseを相互に比較し、実際にどの代謝生成物をターゲットとしてリスク評価を行うべきかを考察する。

7.2 パラベンゾキノン (*p*-BQ)

p-BQの毒性については、皮膚や眼に対する強い刺激性があり、動物実験で催腫瘍性が報告されている [1, 2]。IARCによる*p*-BQのヒトに対する発がん評価は、Group 3、すなわち「ヒトに対する発がん性の疑わしい物質」に分類している。ちなみに変異原性試験に関するこれまでの報告は、Ames試験で陽性、SCE (姉妹染色分体交換試験) では陽性である。

第4章では、シャトルベクタープラスミドpMY189を用いてヒトWI38-VA13細胞に対して変異原性を有することを確認した。*p*-BQによる誘発突然変異は塩基対置換が多く、その多くがG:C塩基対の置換であった。自然突然変異で多く見られた数10~100塩基以上の欠失および挿入は*p*-BQによる突然変異ではあまり見られなかった。自然突然変異と*p*-BQが誘発した突然変異のスペクトルとを比較したところ、ホットスポットが一致するところもあったが、*p*-BQが誘発した突然変異でのみホットスポットとなっているサイトもあり、自然突然変異とは異なる*p*-BQ特有の突然変異機構の存在を示唆する結果を得た。

7.3 ムコンアルデヒド (MUC)

ムコンアルデヒド (以下、MUC) は、マウスを用いた動物実験により赤血球数、ヘマトクリット (赤血球容積率)、骨髓細胞のヘモグロビンを減少させることが観察され、強い骨髓毒性を持つとされている [3]。Ames試験では、代謝酵素を含むS9 mix存在下でTA 97, TA100, TA102株で、またTA104株ではS9 mixの有無にかかわらず、MUCは弱い陽性を示し [4, 5]、培養細胞V79を用いたHPRT遺伝子突然変異試験では、MUCの顕著な変異原性が確認された[5]。さらにMUCは、c-fos遺伝子やc-jun遺伝子といった原がん遺伝子の遺伝子発現を増加させることが観察されており、ベンゼンの発がん機構に重要な影響を与えているのではないかと示唆されている[6]。

第5章では、シャトルベクタープラスミドpMY189を用いてヒトWI38-VA13細胞に対してMUCが変異原性を示すことを確認した。シャトルベクタープラスミドpMY189を100 mMのMUCで処理すると、然変異頻度はバックグラウンド (MUC濃度0 mM) の 2.0×10^{-4} から 5.2×10^{-3} と約25倍に増加した。自然突然変とMUCが誘発した突然変異の変異型を調べたところ、タンデム型の塩基置換の割合が自然突然変異では2.2%であるのに対し、MUCが誘発した突然変異では13.3%あり、有意な差があると確認された。

7.4 ハイドロキノン

ベンゼンを摂取した動物の骨髓中にはHQが残存し、骨髓細胞を著しく減少させることが知られている [7]。またHQは、DNA合成阻害試験、不定期DNA合成試験、小核試験、Ames試験 (-S9)、姉妹染色分体交換試験で陽性と報告されている[2]。動物実験では催新生物性も報告されており、ACGIHは発癌性評価をA3[動物実験で発がん性が認められた物質]に分類している。ただしIARCはヒトに対する発がん性評価をGroup 3「ヒトに対する発がん性の疑わしい物質」に分類している。

ベンゼンが毒性を発現する機構には、代謝生成物質自体だけでなく、代謝生成物質から生成する活性酸素種も大きな役割を果たしていると考えられている[8, 9]。HQは、生体内の酵素であるNADHと2価の銅イオンの存在下で酸化還元サイクルを生じ、活性酸素を生成することが確認されている[10]。

第6章では、NADHおよびCu(II)存在下で、HQがDNA鎖を断片化すること、さらにヒトWI38-VA13細胞において変異原性を示すことを確認した。突然変異頻度はHQの濃度増加とともに上昇し、バックグラウンド (HQ濃度0 mM) では 2.1×10^{-4} であった突然変異頻度が、HQ濃度100 mMでは 4.9×10^{-3} と約23倍に増加した。HQ酸化還元処理突然変異のうち最も多い変異のタイプは欠失で、自然突然変異では全体の19.6%しかないのに対し、HQの酸化還元による突然変異では全体の42.4%を占めており、有意な差を確認した。またsupF遺伝子から欠失したDNAは41b以上のものが全体の75%を占めていた。HQ酸化還元処理突然変異と自然突然変異とでは、塩基対置換のタイプが非常によく似ていた。またHQの酸化還元反応により誘発された突然変異スペクトルは、H₂O₂誘発突然変異の塩基対置換のタイプともよく似てお

り、HQ酸化還元処理誘発突然変異の塩基置換はH₂O₂により誘発される塩基置換と同じ機構で誘発されていると考えられる。

7.5 突然変異誘発能およびスペクトルの比較

p-BQ, MUC, HQ (酸化剤、還元剤存在下における) について、処理濃度と突然変異頻度との関係をFig. 7-1に示す。

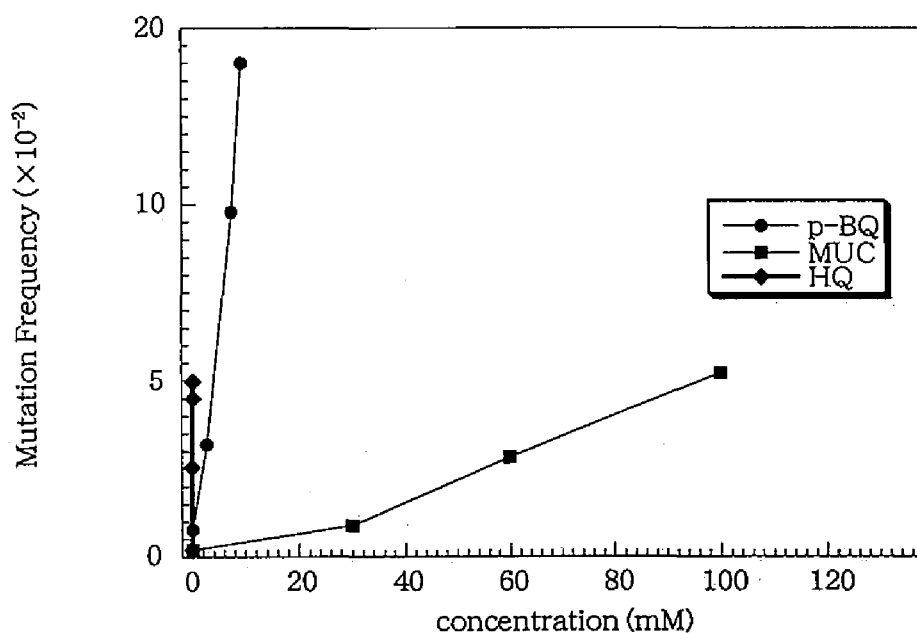


Fig. 7-1 ベンゼン代謝生成物による突然変異頻度

他の2物質に較べて、HQによる突然変異頻度が急激に上昇していることが分かる。3物質について、処理濃度と突然変異頻度を回帰式で表すと、

$$p\text{-BQ: } y = 7.05 \times 10^{-5} + 0.0014X \quad (R=0.99)$$

$$\text{MUC: } y = -1.76 \times 10^{-3} + 5.18 \times 10^{-5}X \quad (R=0.99)$$

$$\text{HQ: } y = 6.18 \times 10^{-3} + 0.032X \quad (R=0.97)$$

ここに

y: 突然変異頻度 [-]

x: 処理濃度 [mM]

3物質による突然変異誘発能は、上の回帰式の傾きに表れると考えられる。Fig. 7-2に突然変異誘発能をレーダーグラフで示した。

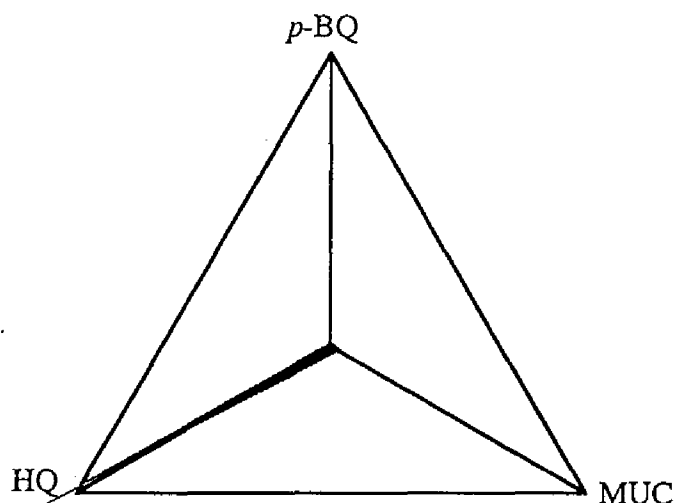


Fig. 7-2 代謝物による突然変異能

この図からも3物質のうち、最も突然変異ポテンシャルが高いのは酸化剤、還元剤存在下におけるHQであり、そのポテンシャルは、*p*-BQの約15倍、MUCにおいては約600倍にもものぼる。*p*MY189をHQで処理する際に添加した還元剤、酸化剤は、それぞれNADH、Cu(II)であり、ともに生体内に存在し、生体内で重要な働きを持つ物質である。NADHは、エネルギー代謝に不可欠の物質である。また、Cuは、血液中には $\sim 16 \mu\text{g/ml}$ 含まれており[11, 12]、他の必須微金属と同様に主として金属酵素の主要な構成成分として種々の反応における触媒作用を有する。Znとともに活性酸素種である O_2 を分解する酵素に含まれ、活性酸素によるダメージを防ぐ上で重要な働きを担っている。しかし、HQにとっては、そのCuが酸化還元サイクルを回すドライビングフォースとなり、突然変異を誘発させる。

Fig. 7-3には、*p*-BQ, MUC, HQによる突然変異の内訳を、自然突然変異とともに示した。*p*-BQでは、シングル型の塩基対置換が最も多く見られた。シングル型の塩基置換は、他の代謝物でも多く見られるが、*p*-BQによる突然変異型で特徴的なのは、他の物質に較べフレームシフト型の突然変異が多く見られる(8.1%)ことである。*p*-BQについては第3章において、DNA付加体が形成されることを確認している。また、Singerらは、G、C、A塩基に形成した付加体の構造を決定している[13, 14]。*p*-BQが付加体を形成したために、シングル型の塩基置換が誘発されたと考えられる。*p*-BQのDNA付加体が形成されたDNAは、通常とは異なる方法で修復されることが報告されている[13]。通常は、まず付加体が形成され

た塩基を除去し、APサイトと呼ばれる部位を作ってから、APエンドヌクレアーゼがその部位を切断し、正しい塩基を埋めることで修復する。しかし、*p*-BQによるDNA付加体の場合は、APエンドヌクレアーゼが、APサイトが形成される前に付加体の5'側に切れ目を入れ、付加体塩基をDNAにぶら下げた状態 (dangling base) で、修復を行う。このdangling baseのために、*p*-BQによる突然変異にフレームシフト型の突然変異が多いのではないかと考えられる。MUCでも、最も多く見られるのはシングル型の塩基対置換である。しかし、MUCで最も特徴的な変異型はタンデム型塩基対置換である。タンデム型塩基置換は、その41.7%がGG またはCC サイトに誘発されている。MUCと同じくアルデヒド化合物であるアセトアルデヒド・アクロレインについては、隣り合ったGG塩基間を架橋することによって、GGまたはCCサイトに特異的にタンデム型塩基置換が起きることが報告されている[15, 16]。アルデヒド基を二つ有するMUCも、上記の2物質と同様にGG間を架橋し、イントラストランド・クロスリンクを形成することによってタンデム型塩基置換が誘発される考えることができる。

HQでは欠失が最も多く特徴的な変異型である。欠失したDNAサイズも大きく、41b以上の欠失が全体の75%を占めている (Table6-2参照)。多種の変異原による突然変異の解析結果では、主要な突然変異型は塩基対置換である。しかし欠失を多く誘発する数少ない変異原として、過酸化水素が報告されている[17]。過酸化水素は、HQの酸化還元サイクルにより発生することが確認されている[10]。

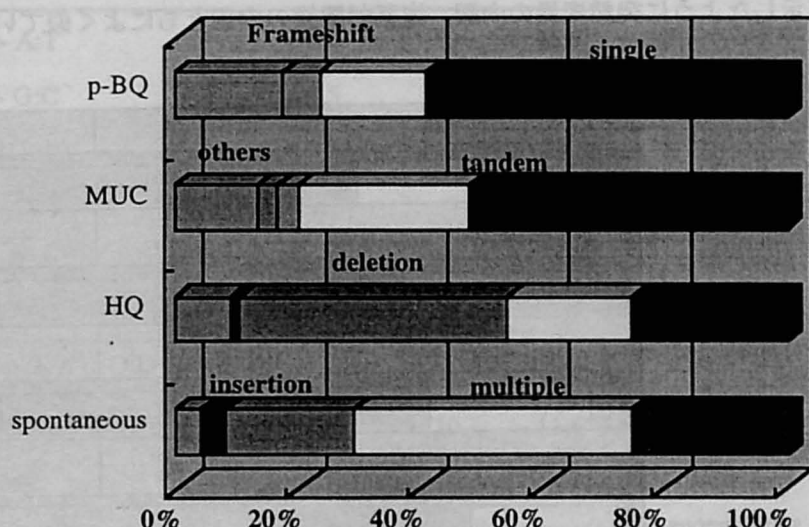


Fig. 7-3 突然変異タイプの内訳

Fig. 7-4には、*p*-BQ, MUC, HQによる塩基対置換の内訳を、自然突然変異による塩基対置換とともに示した。*p*-BQによる塩基置換は、G:C塩基対からT:A塩基対への置換が最も多く (37.5%)、次に多いのがG:C塩基対からA:T塩基対への置換 (27.1%) であり、A:T塩基対の置換に比べG:C塩基対の置換がはるかに多かった (87.5%) が、自然突然変異の場合よりもA:T塩基対の置換が多く見られた。*p*-BQは

DNAのG、C、A塩基と付加体を形成することが報告されており[13, 14]、また、第3章で行ったポリメラーゼストップアッセイの結果でも同様にG、C、A塩基とよく付加体を形成することを確認しており、上記の結果を支持する。

また、A塩基またはT塩基への置換（69.8%）（相補鎖であるため両者の区別はできない）がG塩基またはC塩基への置換（30.2%）に比べて多く見られるが、これは、DNA修復の際、A塩基を優先的に導入するという法則（A rule）[18]が働いたためであると思われる。

MUCによる塩基対置換では、G:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く（29.6%）、次に多いのがG:C塩基対からT:A塩基対への置換であった（22.2%）。MUCは遊離ヌクレオシドであるデオキシグアノシン、デオキシアデノシンとは付加体を形成することがすでに報告されており[19]、MUCがDNAの塩基のグアニンとアデニンに特異的に損傷を与えることにより、G:C及びA:T塩基対において塩基置換が誘発されていると考えられる。タンデム型塩基置換は、その41.7%がGG またはCC サイトに誘発されている。GG間を架橋し、イントラストランド・クロスリンクを形成することによってタンデム型塩基置換が誘発される考えることができる。

HQによる塩基対置換では、G:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く（39.5%）、次いでG:C塩基対からT:A塩基対への置換（34.6%）、A:T塩基対における塩基置換は少なかった（2.5%）。自然突然変異の原因は、複製の際のエラーや活性酸素であると言われているが、自然突然変異とHQによる突然変異は、Fig. 7-3, 4に示したように突然変異の内訳、塩基対置換の内訳ともによく似ていることが分かる。

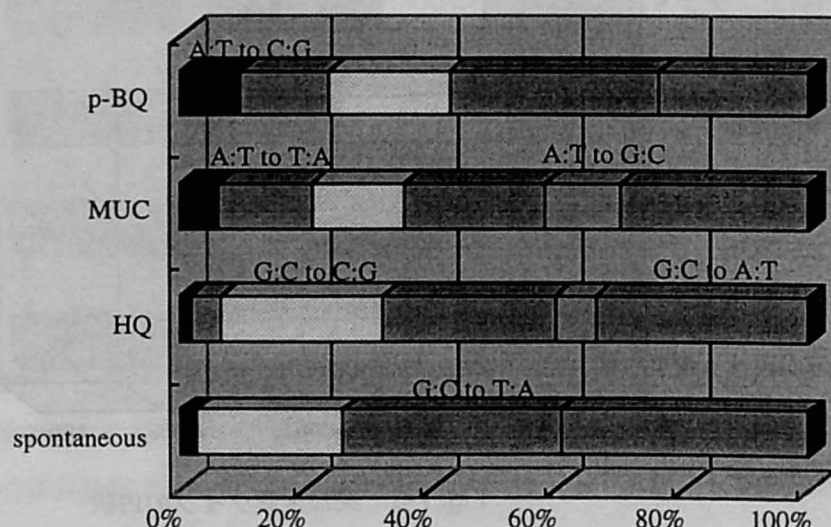


Fig. 7-4 塩基対置換の内訳

ところで、Big Blue mouseは生体内での突然変異検出システムとして作成されたトランスジェニックマウスである。

ウスであるが、このBig Blue mouseのMutation DatabaseがWeb上で利用可能である[20]。ベンゼンを摂取させた際の突然変異スペクトルの解析結果を、Table 7-1に示す。Table 7-1には、DMSO（変異原性がないことが確認されている。変異原物質の脂溶性が高いときに、溶媒として広く使われる）のみを摂取させた際の突然変異スペクトルを併せて示した。Benzeneによる突然変異で最も多いのは、G:C塩基対からA:T塩基対への置換で、全体の46.5%を占めているが、DMSOのみを摂取させた場合もG:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く、50%を占めている。Benzeneによる突然変異型で特徴的なのはDeletion（欠失）が、多く見られることである。欠失は全体の約20%を占めている。ちなみにDatabase上では、数%以上の欠失が見られる物質は、DMN（ジメチルニトロソアミン）とγ線のみである。このことから、マウスがベンゼンを摂取したとき、マウスの生体内では欠失を誘発するような物質が生成し、その物質による突然変異が顕著に表れていると考えられる。

Fig. 7-1, 2に示したように突然変異誘発能の点からも、Fig. 7-3, 4, Table 7-1に示した突然変異スペクトルの点からも、ベンゼン代謝物による突然変異には、HQが最も大きく寄与すると考えられる。

Table 7-1 ビッグブルーマウスにおける
突然変異スペクトル

Classes	DMSO		Benzene	
	Number	%	Number	%
G:C → A:T	11	50.0	40	46.5
A:T → G:C	1	4.5	1	1.2
G:C → T:A	2	9.1	5	5.8
G:C → C:G	2	9.1	4	4.7
A:T → T:A	0	.	4	4.7
A:T → C:G	3	13.6	1	1.2
Frameshift				
- 1 base	3	13.6	10	11.6
+ 1 base	0	.	0	.
Deletions	0	.	17	19.8
Insertions	0	.	1	1.2
Complex	0	.	1	1.2
Double Subst.	0	.	2	2.4
Total		100.0	86	100.0

出典：The Big Blue Website, <http://eden.ceh.uvic.ca/bigblue.htm>

DNAのG、C、A塩基と付加体を形成することが報告されており[13, 14]、また、第3章で行ったポリメラーゼストップアッセイの結果でも同様にG、C、A塩基とよく付加体を形成することを確認しており、上記の結果を支持する。

また、A塩基またはT塩基への置換（69.8%）（相補鎖であるため両者の区別はできない）がG塩基またはC塩基への置換（30.2%）に比べて多く見られるが、これは、DNA修復の際、A塩基を優先的に導入するという法則（A rule）[18]が働いたためであると思われる。

MUCによる塩基対置換では、G:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く（29.6%）、次に多いのがG:C塩基対からT:A塩基対への置換であった（22.2%）。MUCは遊離ヌクレオシドであるデオキシグアノシン、デオキシアデノシンとは付加体を形成することがすでに報告されており[19]、MUCがDNAの塩基のグアニンとアデニンに特異的に損傷を与えることにより、G:C及びA:T塩基対において塩基置換が誘発されていると考えられる。タンデム型塩基置換は、その41.7%がGG またはCC サイトに誘発されている。GG間を架橋し、イントラストランド・クロスリンクを形成することによってタンデム型塩基置換が誘発される考えることができる。

HQによる塩基対置換では、G:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く（39.5%）、次いでG:C塩基対からT:A塩基対への置換（34.6%）、A:T塩基対における塩基置換は少なかった（2.5%）。自然突然変異の原因は、複製の際のエラーや活性酸素であると言われているが、自然突然変異とHQによる突然変異は、Fig. 7-3, 4に示したように突然変異の内訳、塩基対置換の内訳ともによく似ていることが分かる。

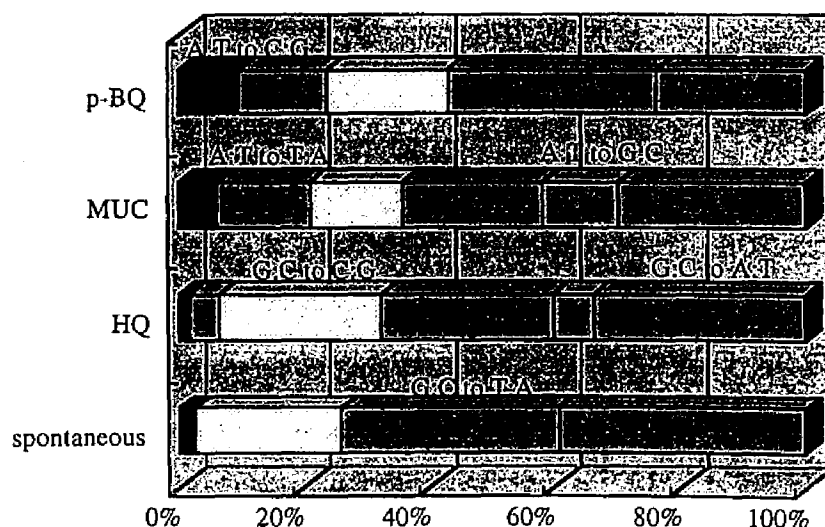


Fig. 7-4 塩基対置換の内訳

ところで、Big Blue mouseは生体内での突然変異検出システムとして作成されたトランスジェニックマ

ウスであるが、このBig Blue mouseのMutation DatabaseがWeb上で利用可能である[20]。ベンゼンを摂取させた際の突然変異スペクトルの解析結果を、Table 7-1に示す。Table 7-1には、DMSO（変異原性がないことが確認されている。変異原物質の脂溶性が高いときに、溶媒として広く使われる）のみを摂取させた際の突然変異スペクトルを併せて示した。Benzeneによる突然変異で最も多いのは、G:C塩基対からA:T塩基対への置換で、全体の46.5%を占めているが、DMSOのみを摂取させた場合もG:C塩基対からA:T塩基対への置換が最も多く、50%を占めている。Benzeneによる突然変異型で特徴的なのはDeletion（欠失）が、多く見られることである。欠失は全体の約20%を占めている。ちなみにDatabase上では、数%以上の欠失が見られる物質は、DMN（ジメチルニトロソアミン）と γ 線のみである。このことから、マウスがベンゼンを摂取したとき、マウスの生体内では欠失を誘発するような物質が生成し、その物質による突然変異が顕著に表れていると考えられる。

Fig. 7-1, 2に示したように突然変異誘発能の点からも、Fig. 7-3, 4, Table 7-1に示した突然変異スペクトルの点からも、ベンゼン代謝物による突然変異には、HQが最も大きく寄与すると考えられる。

Table 7-1 ビッグブルーマウスにおける
突然変異スペクトル

Classes	DMSO		Benzene	
	Number	%	Number	%
G:C -> A:T	11	50.0	40	46.5
A:T -> G:C	1	4.5	1	1.2
G:C -> T:A	2	9.1	5	5.8
G:C -> C:G	2	9.1	4	4.7
A:T -> T:A	0	.	4	4.7
A:T -> C:G	3	13.6	1	1.2
Frameshift				
- 1 base	3	13.6	10	11.6
+ 1 base	0	.	0	.
Deletions	0	.	17	19.8
Insertions	0	.	1	1.2
Complex	0	.	1	1.2
Double Subst.	0	.	2	2.4
Total		100.0	86	100.0

出典：The Big Blue Website, <http://eden.ceh.uvic.ca/bigblue.htm>

7.6 まとめ

本章で得られた結論を以下にまとめる。

- (1) 突然変異ポテンシャルが最も高いのは酸化剤、還元剤存在下におけるHQであり、そのポテンシャルは、*p*-BQの約15倍、MUCの約600倍である。
- (2) HQでは欠失が最も多く特徴的な変異型である。欠失したDNAサイズも大きく、41b以上の欠失が全体の75%を占めている (Table6-2 参照)。
- (3) ベンゼンによる突然変異型で特徴的なのはDeletion (欠失) が、多く見られることである。欠失は全体の約20%を占めている。ちなみに現時点で公開されているDatabase上では、数%以上の欠失が見られる物質は、DMN (ジメチルニトロソアミン) と γ 線のみである。このことから、マウスがベンゼンを摂取したとき、マウスの生体内では欠失を誘発するような物質が生成し、その物質による突然変異が顕著に表れていると考えられる。
- (4) ベンゼン代謝生成物による突然変異には、HQが最も大きく寄与すると考えられる。

参考文献

1. Rappaport, S.M., *Threshold limit values, permissible exposure limits, and feasibility: the bases for exposure limits in the United States*, *Am J Ind Med*, 1993, 23(5), p. 683-94.
2. 神奈川県安全科学情報センター, <http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/kisnet>
3. Witz, G., *et al.*, *Short-term toxicity of trans,trans-muconaldehyde*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985, 80(3), p. 511-6.
4. Snyder, R., *et al.*, *The toxicology of benzene*, *Environ Health Perspect*, 1993, 100, p. 293-306.
5. Glatt, H. and G. Witz, *Studies on the induction of gene mutations in bacterial and mammalian cells by the ring-opened benzene metabolites trans,trans-muconaldehyde and trans,trans-muconic acid*, *Mutagenesis*, 1990, 5(3), p. 263-6.
6. Ho, T.Y. and G. Witz, *Increased gene expression in human promyeloid leukemia cells exposed to trans,trans-muconaldehyde, a hematotoxic benzene metabolite*, *Carcinogenesis*, 1997, 18(4), p. 739-44.
7. Goldstein, B.D. and G. Witz, *Benzene*, in *Environmental Toxicants Human Exposure and Their Health Effects*, M. Lippmann (Editor), 1992, Van Nostrand Reinhold, New York, p. 76-97.
8. Kolachana, P., *et al.*, *Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo*, *Cancer Res*, 1993, 53(5), p. 1023-6.
9. Subrahmanyam, V.V., *et al.*, *Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukemia*, *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(5), p. 495-515.
10. Hiraku, Y. and S. Kawanishi, *Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites*, *Cancer Res*, 1996, 56(22), p. 5172-8.
11. Linder, M.C (Editor), *Nutritional Biochemistry and metabolism.*, 1991, Elsevier Science, New York.
12. Sagripanti, J.L., *et al.*, *Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991, 110(3), p. 477-85.
13. Hang, B., *et al.*, *An unusual mechanism for the major human apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease involving 5' cleavage of DNA containing a benzene-derived exocyclic adduct in the absence of an AP site*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(24), p. 13737-41.
14. Singer, B., *DNA damage: chemistry, repair, and mutagenic potential*, *Regul Toxicol Pharmacol*, 1996, 23(1 Pt 1), p. 2-13.
15. Matsuda, T., *et al.*, *Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases*, *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(7), p. 1769-74.
16. Kawanishi, M., *et al.*, *Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids*, *Mutat Res*, 1998, 417(2-3), p. 65-73.

17. Moraes, E.C., *et al.*, *Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis*, Carcinogenesis, 1990, 11(2), p. 283-93.
18. Sagher, D. and B. Strauss, *Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides*, Biochemistry, 1983, 22(19), p. 4518-26.
19. Bleasdale, C., *et al.*, *Chemistry of muconaldehydes of possible relevance to the toxicology of benzene*, Environ Health Perspect, 1996, 104 Suppl 6, p. 1201-9.
20. Boer, J.d., *The Big Blue Website*, <http://eden.ceh.uvic.ca/bigblue.htm>

第8章 ベンゼンによる白血病関連染色体異常誘発確率の推定

8.1 はじめに

ベンゼンはヒトに白血病、とくに急性骨髄性白血病を誘発する物質とされている。白血病は、「造血系細胞が骨髄の中で腫瘍化したもの」と定義される。白血病は大きく骨髄性白血病とリンパ性白血病とに分けることができ、さらに、それぞれ急性と慢性とに分けられる。

骨髄性白血病は、大きく慢性骨髄性白血病（Chronic Myeloid Leukemia、以下CML）と急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia、以下AML）とに分類できる。CMLの場合は、慢性期、移行期、急性転化期という病期を経て進行するが、AMLの場合には、病期という考え方はなく、診断された時はすでに全身性疾患であることを意味する。両者の違いは、腫瘍細胞の分化能の相違に起因するもので、ある一定の段階で分化・成熟能を失い腫瘍化した場合はCMLに、分化・成熟能を保持しつつ腫瘍化した場合にはAMLとなる。AMLはさらに腫瘍細胞の血球系統と分化によって、M0からM7までの8つに分類されるFAB分類と呼ばれる分類が広く用いられている。Table8-1(a) に我が国で1972～1977年に確認されたCMLとAMLの症例数比を、Table8-1(b)に1987年に確認されたAMLにおける病態（FAB分類）の割合を示した[1]。

Table 8-1 (a) 急性骨髄性白血病（AML）および
慢性骨髄性白血病（CML）の症例数比較

	15歳未満		15歳以上		全年齢	
	症例数	%	症例数	%	症例数	%
慢性 (CML)	20	3.6	630	18.6	650	16.5
急性 (AML)	209	37.9	1789	52.7	1998	50.6
全症例	551	100.0	3395	100.0	3946	100.0

出典：全国造血器腫瘍登録調査報告第4報
(昭和47年～52年 症例)、国立がんセンター (1981)

Table 8-1(b) 病態による AMLの症例数

AML FAB分類	15歳未満		15歳以上		全年齢	
	症例数	%	症例数	%	症例数	%
M1	8	33.3	87	20.8	95	21.5
M2	8	33.3	153	36.6	161	36.4
M3	3	12.5	67	16.0	70	15.8
M4	2	8.3	59	14.1	61	13.8
M5	3	12.5	29	6.9	32	7.2
M6	0	0	23	5.5	23	5.2
Total	24	100	418	100	442	100

出典：全国造血器腫瘍登録調査報告 第5報
(昭和56年症例)、国立がんセンター(1985)

1960年、米国フィラデルフィアの研究所においてNowellとHungerfordとによりCMLに特異的な染色体が発見された[2]。この染色体はPh¹染色体（フィラデルフィア染色体、Fig. 8-1参照）と名付けられた。1と数字を添えたのは、引き続き、第二、第三の発見が、このフィラデルフィアの地でなされることが考えたからである。このPh¹染色体は、ヒト9番染色体の長腕部と22番染色体の長腕部との間で起きた転座によって発生した異常染色体であり、95%以上のCML患者に認められる。このPh¹染色体の発見以来、白血病の病型に特異的な染色体異常がづぎづぎに明らかにされている。Table 8-2には、白血病に関連する染色体異常と遺伝子を示した。

染色体は、細胞の核内に存在し、ある種の薬剤で染色することができ、光学顕微鏡による観察が可能な、当初遺伝物質と考えられていた物質である。実際は、染色体はDNAとタンパク質が複雑に折り畳まれて形成されている。光学顕微鏡で観察が可能な染色体レベルの研究と分子としてのDNAレベルの研究とは、これまで相互に無関係に進められる傾向があった。しかし近年、分子細胞遺伝学における発展は、染色体に関する知見を分子レベルで解明することを可能にし、遺伝子を染色体上にマップすることも実現している。Ph¹染色体についても、ABL遺伝子とBCR遺伝子との間で相互に転座することにより発生することが分かっている。他に、6番染色体と9番染色体との間の転座におけるCAN遺伝子とDEK遺伝子、15番、17番間の転座におけるPML遺伝子とRAR α 遺伝子、8番21番間の転座におけるAML-1遺伝子など、白血病の病態に直接関与すると思われる責任遺伝子が次々に解明されている[3]。

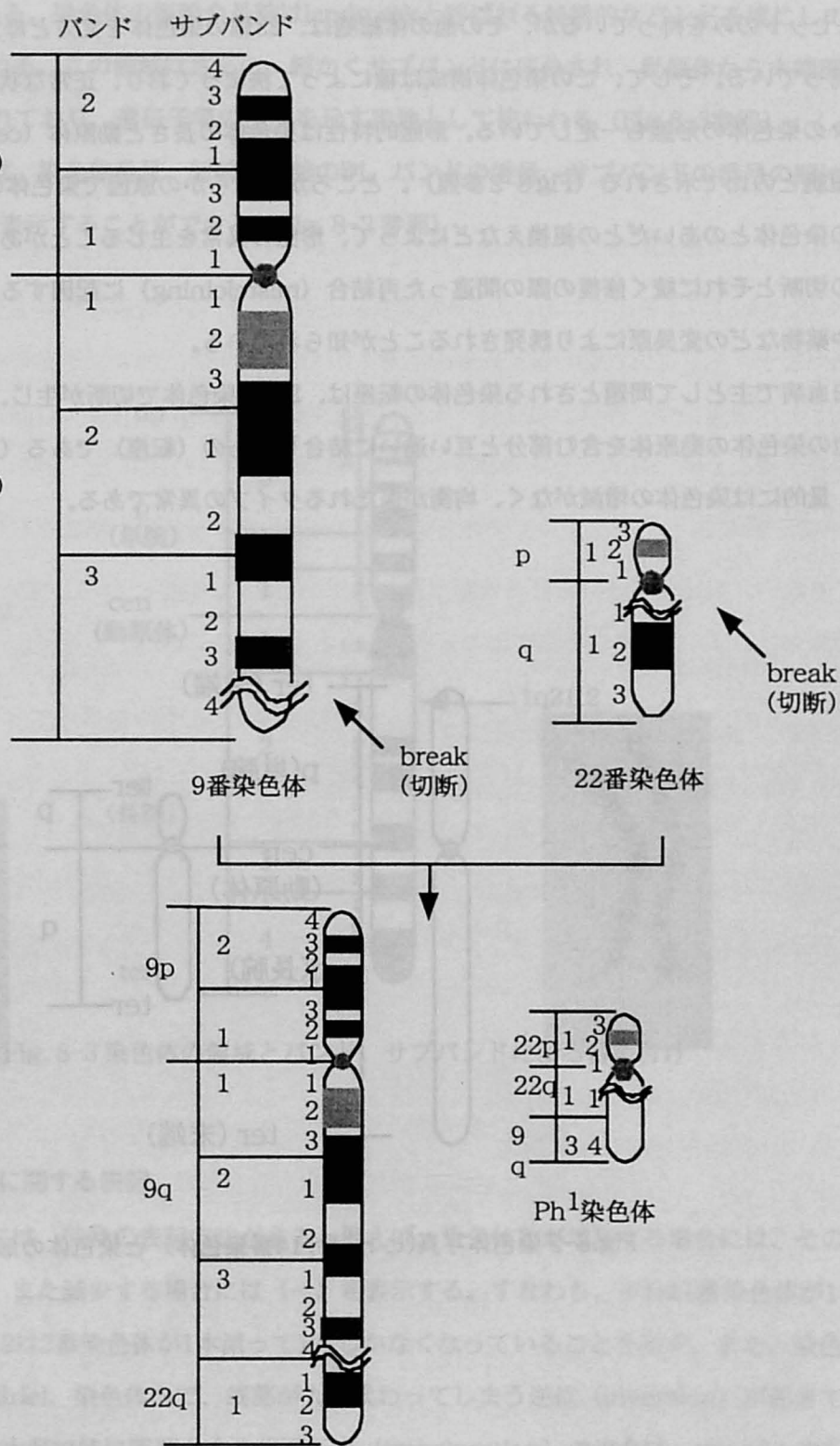
白血病と染色体異常とは密接に関係している。白血病誘発の生物学的メカニズムに依拠して、ベンゼ

ンによる白血病誘発リスクを評価するために、染色体異常が誘発される確率（リスク）を知ることは必須の要件である。これまで放射線については発がんのあらゆる段階において多岐に渡る研究がなされ、その成果は種々の放射線リスク評価に利用されている。本章では、その成果をベンゼンに適用し、白血病関連染色体異常誘発リスクを評価することを試みる。

Table 8-2 病型特異的染色体異常と
関連する遺伝子との関係

染色体異常型	AML- FAB分類	関連遺伝子
t (8;21)(q22;q22)	M2	AML-1
t (15;17)(q22;q11)	M3	PML, RAR α
t /del (11)(q23)	M5	MLL
inv/del (16)(q22)	M4	MT
Ph	M2	ABL, BCRa
t (6;9)(p23;q34)	M2, M4	DEK, CAN
inv (3)(q21q26)	M1	TF, TFR, LTF

出典：佐藤裕子、血液疾患と染色体異常、中外医学社（1993）

Fig. 8-1 Ph^1 染色体 ($\text{t}(9;22)(\text{q}34;\text{q}11)$)の発生

8.2 染色体異常

8.2.1 DNA鎖切断と染色体異常

正常なヒトの細胞は、22本の常染色体と1本の性染色体を1セットとして持っている。生殖細胞は、この1セットのみを持っているが、その他の体細胞は、23個の染色体を父方と母方の2セット、すなわち46本持っている。そして、この染色体構成は種によって決まっており、正常な状態では、数だけでなく個々の染色体の形態も一定している。形態的特性は染色体の長さで動原体（centromere）を挟む長腕と短腕との比で示される（Fig.8-2参照）。ところが、何らかの原因で染色体の一部が欠失したり、他の染色体とのあいだとの組換えなどによって、形態の異常を生じることがある。これらの異常はDNA鎖の切断とそれに続く修復の際の間違った再結合（misrejoining）に起因すると考えられており、放射線や薬物などの変異原により誘発されることが知られている。

白血病で主として問題とされる染色体の転座は、2つの染色体で切断が生じ、動原体を含まない部分が他の染色体の動原体を含む部分と互い違いに結合したもの（転座）である（Fig.8-1参照）。転座は、量的には染色体の増減がなく、均衡が保たれるタイプの異常である。

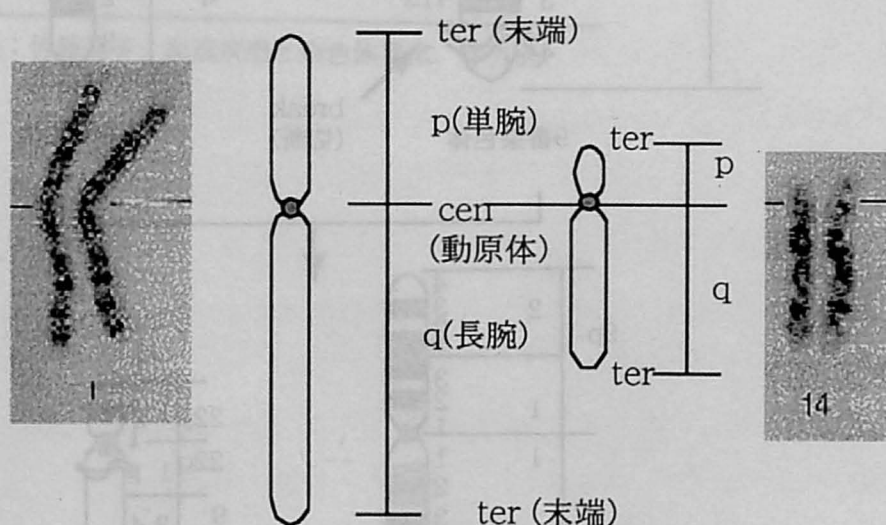


Fig.8-2 染色体写真(ヒト1番, 14番染色体) と染色体の形状

8.2.2 染色体各部の名称と記号

染色体は動原体（centromere, cen）を境として、短腕（p）と長腕（q）とに分かれる（Fig. 8-2 参照）。短腕をpとするのは、フランス語のpetitに由来し、アルファベットではpの次にqが並ぶことから長腕をqで表現している。染色体の短腕や長腕はlandmarkと呼ばれる特徴的なバンドを境にして、いくつかの領域に区分される。この領域はさらに、細かくサブバンドに区分され、動原体から末端部に向かって番号が付けられており、遺伝子等の住所を示す番地として使われる（Fig. 8-3 参照）。したがって、染色体上の位置は、染色体番号、短腕・長腕の別、バンドの番号、サブバンドの番号の順に、例えば1q 21.2等と、番号表示することができる（Fig. 8-3 参照）。

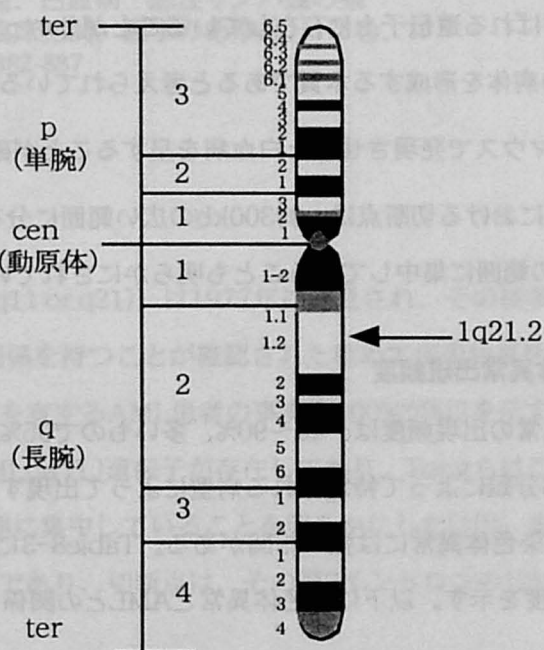


Fig. 8-3 染色体の領域とバンド、サブバンドによる番地付け

8.2.3 染色体数の異常に関する表記

染色体異常を表すには、独特の表記方法がある。例えば、染色体数が増加する場合には、その染色体番号の前に（+）を、また減少する場合には（-）を表示する。すなわち、+1は1番染色体が1本増えて3本あることを、-2は2番染色体が1本減って1本しかなくなっていることを示す。また、染色体に欠失が起きている場合はdel、染色体内で、端部が入れ代わってしまう逆位（inversion）が起きている場合はinvと表示する。本章で特に問題とする相互転座（translocation）の場合は、t(m;n)と表記する。例えば、t(8;21)(q22;q22)は、8番染色体の長腕部22に位置するところと、21番染色体の長腕部22に位置するところとに、切断が生じ、相互に転座したことを示す（Fig. 8-1 参照）。CMLに特徴的なPh¹染

染色体 (Fig. 8-1 参照) は、t(9;22)(q34;q11)と表される。

8.3 白血病に特異的な染色体異常

8.3.1 CMLとPh¹染色体

1960年、フィラデルフィアの研究所で発見されたフィラデルフィア染色体 (Ph¹染色体、Fig 8-1 参照) は、CML患者の95%以上に観察される。このPh¹染色体については、数多くの研究がなされ、原因の遺伝子とその機能に関する知見はかなり蓄積されている。Ph¹染色体は染色体異常表記方法に従えばt(9;22)(q34;q11)と表記される。9番染色体長腕上のバンド34と22番染色体長腕上のバンド11の領域で切断が起き、相互に入れ替わって転座が起きるのである。9番、22番染色体の切断点は、それぞれABL遺伝子とBCR遺伝子と呼ばれる遺伝子上に存在していることが分かっており、これらの遺伝子がキメラを形成することがCMLの病体を形成する本質であると考えられている。実際、このキメラ遺伝子のひとつ、BCR-ABL遺伝子をマウスで発現させると白血病を呈することが確認されている。Ph¹染色体を形成する際の、ABL遺伝子における切断点は、約300kbの広い範囲に分布しているが、BCR遺伝子における切断点はわずか5.8kbの範囲に集中していることも明らかにされている[4]。

8.3.2 AMLにおける染色体異常出現頻度

AMLにおける染色体異常の出現頻度は、40～90%、多いもので95%以上であると報告されている[5]が、AMLの場合は、FAB分類によって特定される病型によって出現する染色体異常が異なる。しかし病型のFAB分類と出現する染色体異常には強い相関がある。Table 8-3に特定の病型 (FAB分類) における、染色体異常の出現頻度を示す。以下に染色体異常とAMLとの関係を説明する。

8.3.3 AMLと 8;21転座

8;21転座 (t(8;21)(q22;q22)) は、1973年Rowleyにより発見された[5]。この転座は、8番染色体長腕上のバンド22と21番染色体長腕上のバンド22との間で起きる相互転座で、出現頻度は、報告によって異なるが、我が国ではM2症例に多く見られ、この転座を有するAML患者の事実上100%がM2を示すともされている[6]。Miyoshiらは、21番染色体上の転座切断点にまたがる遺伝子を単離し、この遺伝子をAML1と命名、さらに切断点は、AML1の同一イントロン (遺伝子内にあつて、転写されない介在配列) に集中していることを明らかにした[7]。またYaspoらは、この切断点は100kbの範囲に集中しているとしている[8]。一方、8番染色体上の転座切断点にはETO(あるいはMTG8) 遺伝子が存在しており、この遺伝子は87kbの範囲に13のエクソン (翻訳配列) を有している[9]。

Table 8-3 急性骨髄性白血病の病型 (FAB分類) よる各病型毎の染色体異常頻度分布(%)

病態	Ph ¹	t(8;21)	t(15;17)	t11q23	inv(16)
CML	95				
AML					
M1					
M2	5	35		5	
M3			90		
M4					25
M5				15	

出典：桜井雅温、白血病・悪性リンパ腫の染色体異常と臨床相関、医学のあゆみ、175巻、13号 (1995) pp.882-887

8.3.4 AMLと15;17転座

15;17転座 (t(15;17)(q22;q11 or q21)) は1977年に発見され、その後多くの症例報告によりFAB分類における病型M3と密接な関係を持つことが確認された極めて疾患特異性の高い染色体異常である。またt(8;21)とともに、この転座を有するAML患者の事実上100%がM2を示すともされている[6]。15番染色体の上の転座切断点にはPML(MYL)遺伝子が存在しており、Tongらはこの転座をもつ22患者中20の症例で、切断点が4.4kbの範囲に集中していることを明らかにした[10]。また17番染色体上の転座切断点に存在する遺伝子はRAR α であり、切断点は、その第2イントロンの12kbの範囲に集中していることが確認されている[11, 12]。

8.4 ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座誘発確率の評価

8.4.1 ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座誘発確率評価の手順

本章では、ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座誘発リスクを求めることを目的にしている。ベンゼンは、その代謝生成物が発がんのイニシエーションを誘発する。第7章における検討から代謝物のうちHQ (Hydroquinone) の酸化還元反応によって発生するH₂O₂が、発がんのイニシエーションに大きく寄与することが分かった。本章ではベンゼンによる白血病のイニシエーターは標的臓器である骨髓中に存在するHQであると仮定し、これが白血病に特異的な染色体転座を誘発する確率を推定する。この確率推定手順は以下の通りである。Fig.8-4に確率推定手順の概略を示す。

0. 先行研究・調査を参照して、ベンゼンのヒトへの曝露量を把握する。

1. ヒトに対するベンゼンのPBPKモデルを利用して、ベンゼンの曝露量を骨髓中HQ濃度に換算する。
2. ベンゼンの曝露により発生した骨髓中HQが誘発するDNA2本鎖切断（Double strand breaks, DSBs）の量を推定する。
3. SMBEモデルを用いて、DSBsの修復の際に誤った結合をするmisrejoining量を推定する。
4. 3. で推定したmisrejoiningにより白血病に特異的な染色体転座の誘発確率を推定する。

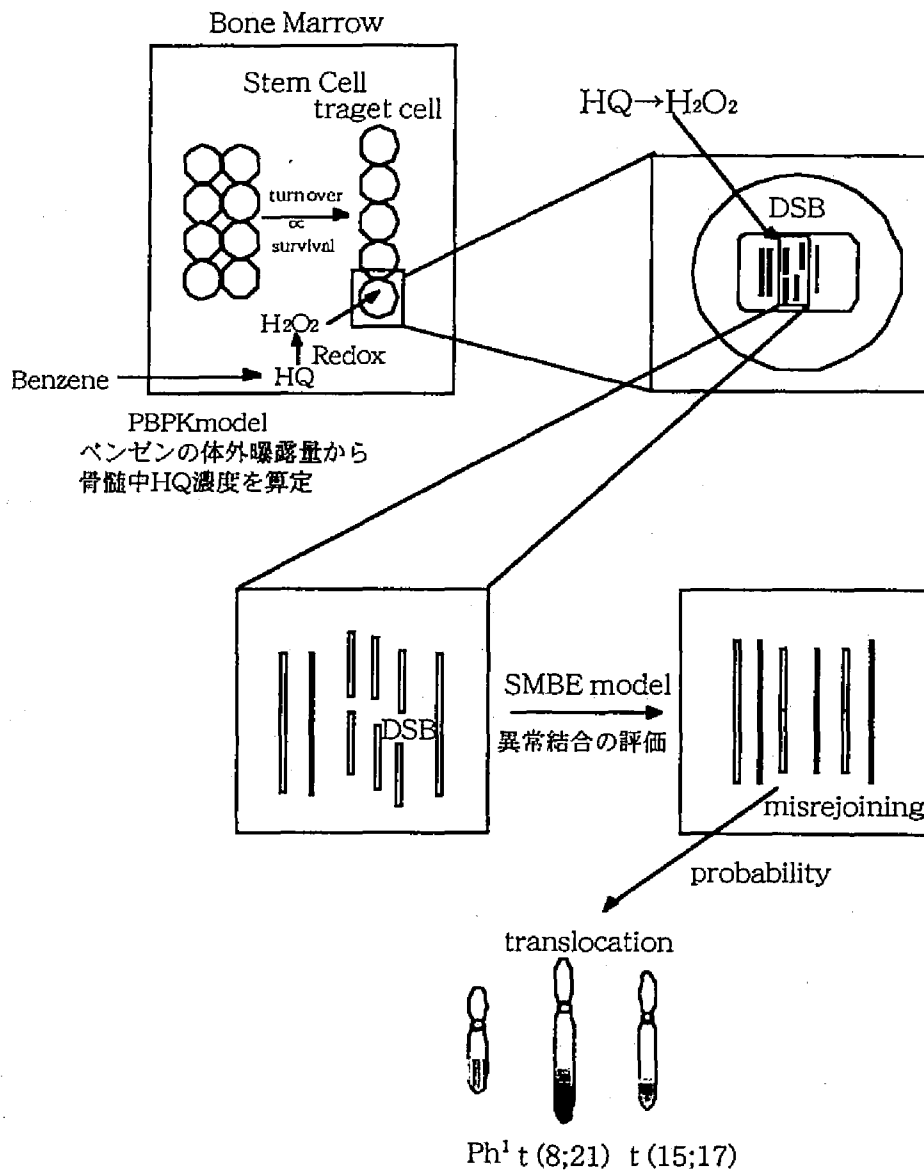


Fig. 8-4 ベンゼン曝露による白血病特異的な染色体転座の発生確率算定手順

8.4.2 ベンゼン曝露によるHQの生成量

ベンゼンのように、それ自体ではなくその代謝物が発がんのイニシエーターとして物質の場合は、代謝の親物質そのものの摂取量だけでなく標的臓器における代謝生成物量を評価することが重要である。日高は、代謝等の生理学的情報と組織－血液間の分配率等の物理化学的情報とが組み込まれた、薬物の体内動態評価モデル（Physiologically based Pharmacokinetic, PBPKモデル）を、ベンゼンとその代謝生成物について構築し、ベンゼン摂取に起因する骨髓中HQ濃度を推定している[13]。ヒトが大気中のベンゼンに曝露されるときにの骨髓中HQ濃度[μM]の関係として、以下の式を与えている。この結果は、疫学データと良好な一致を見ている。

$$y = \frac{1.442x}{1.8916 + x} \quad (R=0.98) \quad (1)$$

ここに

x: 大気中ベンゼン濃度[ppm]

y: 骨髓中HQ濃度[μM]

(1)式は、ベンゼンのヒトに対するPBPKモデルを用いて、所定の大気中ベンゼン濃度（x）に曝露されたヒト骨髓中HQ濃度の平衡値（y）を算定し、両者の相関関係を表現したものである。日高は、5, 50,95パーセンタイル値の各回帰式を与えているが、ここでは50パーセンタイル値の回帰式を用いる。

8.4.3 HQによるDSB

Andreoliらは、HQによるDNA損傷をコメットアッセイを用いて調べている[14]。コメットアッセイでは、スライドガラス上のゲルに包埋した細胞を、界面活性剤と高濃度の塩を含むアルカリ溶液で溶解した後、電気泳動を行う。このとき、1本鎖DNA切断（SSB）とアルカリ易溶出部位があると、核からDNAが移動し、その移動像の長さ、大きさ、形等（Tail Moment値[μm]を用いて定量表現される）からDNA損傷の程度を観察できる。移動像が彗星（コメット）のように見えることから、コメットアッセイと呼ばれている。HQで90分間処理したときの処理濃度(y)とコメットアッセイのTail Moment Valuesとの間には、以下の回帰式が与えられている。

$$\text{TM}=0.291y+0.68 \quad (R^2=0.94) \quad (2)$$

ここに

y: HQ濃度[$\mu\text{g/ml}$]

TM: Tail Moment Values [μm]

ここで、TailMoment値は、以下の式でSSBに換算することができる。

$$SSB = (2.5T - 0.5) \times 10^3 \quad (3)$$

ここに

SSB: 1本鎖切断数[-/cell]

TM: Tail Moment Values [μ m]

また、Oliveらは、コメットアッセイに使用するゲルをアルカリ溶液ではなく中性溶液で溶解し、中性コメットアッセイを行うことで、2本鎖DNA切断（DSB）とアルカリ易溶出部位をTail Momentとして測定した[15]。同時に通常のコメットアッセイを行い、両者のDose-Response曲線の勾配の比を取ることで、1本鎖切断数と2本鎖切断数との比（SSB/DSB）を求めている[15]。彼らは、H₂O₂について95%信頼区間における勾配を用いて、SSB/DSBを3,275（975-40,000）と報告している。HQは、酸化還元反応によってH₂O₂を発生し、このH₂O₂がDNAに損傷を与える。したがって、H₂O₂について得られたSSB/DSB比rを用いて、(3)式をDSBを算定する式に変換する。

$$DSB = SSB \times r^{-1} = (2.5T - 0.5) \times 10^3 \times r^{-1} \quad (4)$$

ここに

DSB: 1本鎖切断数[-/cell]

T: Tail Moment Values [μ M]

r (\equiv SSB/DSB) = 3,275（95%信頼区間は、975-40,000）[-]

ところで、HQの曝露により壊死または自死する細胞は、その後の染色体異常、白血病の誘発に関与しないため、生存細胞に生じたDSBのみを考慮する必要がある。

Colinasらはヒトの骨髓細胞をHQにより24時間処理し、実験的に骨髓細胞の生存率を調べているので[16]、その生存曲線の回帰式を求めた。曝露時間を1時間に換算すると生存率は次の式で表される。

$$S = 0.99078e^{\frac{-0.0024x}{24}} \quad (R^2 = 0.9223) \quad (5)$$

ここに

S: 単位時間(1hour)当たりの骨髓細胞生存率[-]

x: HQ処理濃度 [μ M]

従って、考慮すべきDSBは、

$$DSB = (2.5T - 0.5) \times 10^3 \times r^{-1} \times S \quad (6)$$

で与えられる。

生体内では、細胞死によって失われた細胞は幹細胞によって補充される。従って影響を受ける細胞数は常に等しいが、補充された時刻によって曝露時間が異なることになる。ここでは単位時間を1時間と設定し、以下のように考える。例えば、ターゲットとなる細胞数が $N[\text{cells}]$ のとき、固体がベンゼンに曝露される時間を $n[\text{hours}]$ とすると、 n 回の曝露を受ける（すなわち曝露時間が、 $n[\text{hours}]$ ）細胞数は $NS^n[\text{cells}]$ で与えられ、 $(n-1)$ 回の曝露を受ける（すなわち曝露時間が、 $(n-1)[\text{hours}]$ ）の細胞数は、 $NS^{(n-1)}[\text{cells}]$ で与えられる。一般に、 k 回の曝露を受ける（曝露時間が $k[\text{hours}]$, $(n-1) > k > 1$ のとき）細胞数は、 $NS^k(1-S)$ で与えられるから、平均曝露時間は、次式で算定することができる。

$$\begin{aligned}
 T &= \frac{N \cdot S^n \cdot n + \sum_{k=0}^{n-1} N \cdot S^k \cdot (1-S) \cdot k}{N} \\
 &= nS^n + (1-S) \sum_{k=0}^{n-1} kS^k \\
 &= nS^n + \frac{(1-S^{n+1})}{1-S} - (n-1)S^{n-1}
 \end{aligned} \tag{7}$$

ここに

N : ターゲット細胞数[cells]

S : 単位時間当たりの骨髓細胞生存率[-]

n : ベンゼン曝露時間[hours]

8.4.4 SMBE モデルによるmisrejoiningの推定

SMBE (Sax-Markov binary eurrejoining/misrejoining) モデルは、DNAの2本鎖切断 (Double strand break, DSB) により生じた切断面 (以下、active free end) を2種類に区分し、切断面 (free end) の再結合により異常結合 (misrejoining) が発生する確率を評価するモデルである[17]。その2種類とは、本来結合すべき切断面がすでにmisrejoiningしたDSB free endとそれ以外のDSB free endである。ある細胞内の時刻 t におけるactive free end (まだ結合を完了していない切断面) 数を $2j$ (切断数が j であれば、切断面は $2j$ 個できる)、本来の結合相手がすでにmisrejoining済みのactive free end数を $2i$ 個とする ($j > i > 0$)。このとき、正しい結合をする可能性があるfree end数は $2(j-i)$ 個である。時刻 t までに既におきたmisrejoining数を、 m とする。この状態を $\text{node}(j, i, m)$ と表現し、その状態の生起確率を $P(j, i, m, t)$ とおくと、細胞当たりのmisrejoiningの平均値 $M(t)$ は以下の式で表される。

$$M(t) \equiv \langle m \rangle = \sum_{m=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} \sum_{i=0}^{\min(j, m)} m P(j, i, m, t) \tag{8}$$

最初に与えられるactive free end数を $2j$ から $j=0$ まで積算したときの M が、すなわち、細胞内でDSBが起きたときに最終的に起こりうるmisrejoining数を示している。

時刻 t における全てのDSB free end ($2j$ プール) は、2つのサブクラスに分けられる。本来結合すべき切断面は、すでに間違った結合 (misrejoining) を起こし、正しい結合相手がなくなったactive free endの $2i$ プールと、まだ正しい結合を行う可能性のあるactive free endの $2(j-i)$ プールである (Fig. 8-5 参照)。

このとき、1つのactive free endがとりうる結合とその内容は、以下のように区分することができる。

1. $2(j-i)$ プール内でeurejoining (正しい結合) が起きる。

取りうるeurejoiningの相手は $j-i$ 通り。

このeurejoiningによって、 $\text{node}(j,i,m)$ は $(j-1,i,m)$ に移行する。

2. $2(j-i)$ プール内で misrejoiningが起きる。

取りうるmisrejoiningの相手は $2(j-i)(j-i-1)$ 通り。

$\text{node}(j,i,m)$ は $(j-1,i+1,m+1)$ に移行する。

3. $2i$ プールと $2(j-i)$ プールとの間でmisrejoiningが起きる。

取りうるmisrejoiningの相手は、 $2i \times 2(j-i) = 4i(j-i)$ 通り。

$\text{node}(j,i,m)$ は $(j-1,i,m)$ に移行する。

4. $2i$ プール内でmisrejoiningが起きる。

取りうるmisrejoiningの相手は、 $i(2i-1)$ 通り。

$\text{node}(j,i,m)$ は $(j-1,i-1,m+1)$ に移行する。

5. $2i$ プールと $2(j-i)$ プール間、及び $2i$ プール内でeurejoiningは起きない。

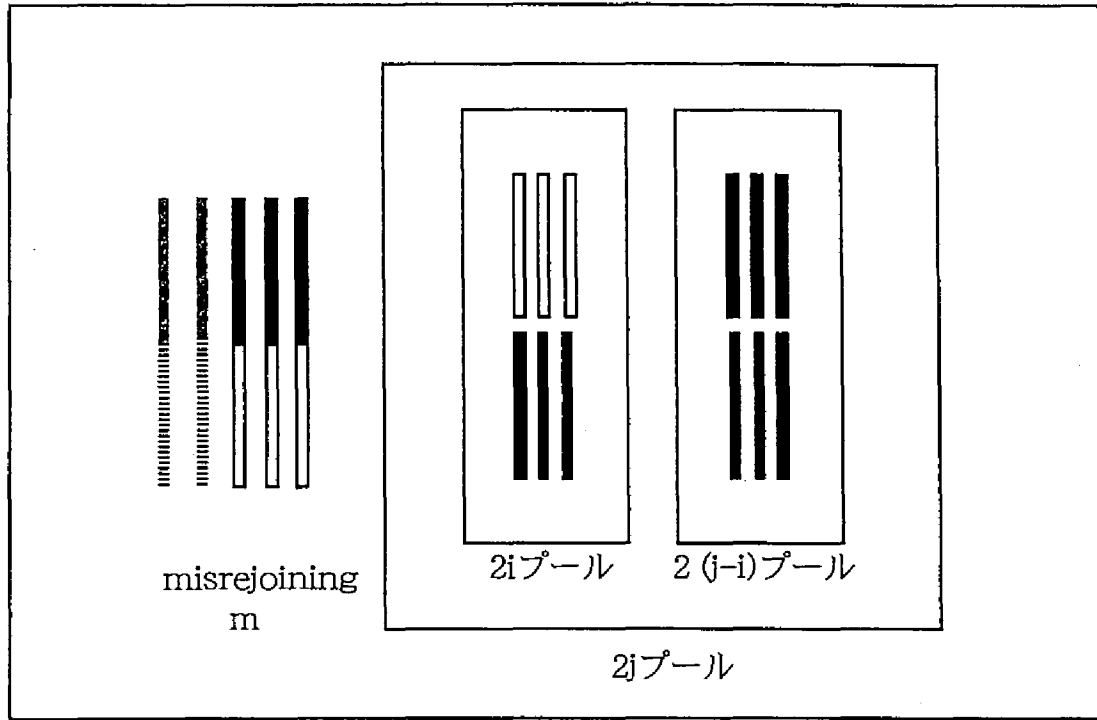


Fig. 8-5 2本鎖切断(DSB)と、そのサブクラス
本来結合すべき切断面がすでに間違った結合 (misrejoining)を起こした
free end(2i プール) のサブクラスと、まだ正しい結合を行う可能性のある
free endのサブクラス (2(j-i) プール)

i 及び m は、active free endが誤結合することによって j が1減少したときにのみ変化する。今、時刻 t においてあるactive free end が他のactive free end と結合する確率が、どのfree end同士においても全て等しく κ であるとする、任意のactive free end が他のactive free end と結合する確率は、次式で与えられる。

$$\kappa [(j-i)+2(j-i)(j-i-1)+i(2i-1)+4i(j-1)]=\kappa j(2j-1) \quad (9)$$

したがって、

1. node $\{j, i, m\}$ が node $\{j-1, i, m\}$ に移行する確率は、 $(j-i)/j(2j-1)$
2. node $\{j, i, m\}$ が node $\{j-1, i+1, m+1\}$ に移行する確率は、 $2(j-i)(j-i-1)/j(2j-1)$
3. node $\{j, i, m\}$ が node $\{j-1, i, m\}$ に移行する確率は、 $4i(j-i)/j(2j-1)$
4. node $\{j, i, m\}$ が node $\{j-1, i-1, m+1\}$ に移行する確率は、 $i(2i-1)/j(2j-1)$

ここで細胞にDSBが生じた時刻を $t=0$ 、細胞1個当りに生じたDSB数を μ (すなわち、 $t=0$ のときの node は $\{\mu, 0, 0\}$) とし、このDSBが各daughter nodeに分割され、最終的に $\{0, *, *\}$ になるまでシミュレートした結果[17]から、総misrejoining数 M は、

$$M(\infty) = \mu - \frac{1}{2} \quad (\mu \gg 1) \quad (10)$$

$$M(\infty) = \frac{2\mu^2}{3} \quad (\mu \ll 1) \quad (11)$$

と近似される。しかしながらDSB active free endの結合は、ランダムに起きるのではなくactive free end同士の距離が影響するというproximity effectが存在する。このproximity effectは、DSB active free endの存在領域をいくつかのsiteに分割することでSMBEモデルに反映されている。核内をDSB free endが均等に存在するような η のサイトに分割すると、細胞内のDSB active free end および misrejoining数は、ひとつのサイト内に存在するDSB active free end および misrejoining数の η 倍であるとする。proximity effectを考慮したときの総misrejoining数 $M(\infty)$ は、

$$M(\infty) = \eta\left(\mu - \frac{1}{2}\right) = \mu - \frac{\eta}{2} \quad (\mu \gg 1) \quad (12)$$

$$M(\infty) = \eta\left(\frac{2(\mu/\eta)^2}{3}\right) = \frac{2\mu^2}{3\eta} \quad (\mu \ll 1) \quad (13)$$

Radvoyevitchらは、このモデルをLOW-LET放射線により誘発された染色体異常に適用し、実際の実験結果と比較したところ、サイト数 η が約400のときに実験値と計算値との良好な一致を確認している[17]。

今、このSMBEモデルをベンゼンについて適用し、ベンゼン曝露によるmisrejoiningを推定する。細胞辺りのDSB数 μ は、 $\mu \ll 1$ であるから、(13)式を用いる。

したがって、misrejoining数 M は、 $\eta=400$ として以下の式で求められる。

$$M = \frac{2DSB^2}{1200} \quad (14)$$

ここに

DSB: 2本鎖DNA切断数[/cell]

M: Misrejoining数[/cell]

8.4.5 白血病に特異的な染色体異常の発生確率

白血病に特異的な染色体転座、t(9;22), t(8;21), t(15;17)の発生確率を評価するため、SMBEモデルによって算定されるmisrejoiningがt(9;22), t(8;21), t(15;17)を形成する確率を求める。

Radvoyevitchらは、1つの細胞内にDSBのmisrejoiningが M 個起きたときに、t(9;22)の染色体転座、

すなわちBCR遺伝子とABL遺伝子におけるmisrejoining、が形成される条件付き期待値、すなわち期待転座数 $E(B-A|M)$ は、以下の式から求められるとしている[18]。

$$\begin{aligned}
 E(B-A|M) &= \left(\frac{4}{\eta^2} \right) \left(\frac{M N_{BCR} (M-1) N_{ABL}}{2\Gamma/\eta} \right) \left(\frac{1}{2(M-1)} \right) \\
 &= \left(\frac{M N_{BCR} (M-1) N_{ABL}}{\Gamma} \right) \left(\frac{1}{2(M-1)} \right) \\
 &= \left(\frac{M N_{BCR} N_{ABL}}{\Gamma^2} \right) \\
 &= 8.5 \times 10^{-11} M
 \end{aligned} \tag{15}$$

ここに

NABL (ABL遺伝子上の切断ターゲットサイズ) として300[kb]を、
NBCR (BCR遺伝子上の切断ターゲットサイズ) として5.8[kb]を[4]、 Γ (ヒトのゲノムサイズ) として3,200[Mb]を用いることにする。 η はproximityeffectモデルにおける核内のサイト数である。

同様に、DSBのmisrejoiningがM個起きたときの8;21転座 (すなわちAML遺伝子とETO遺伝子との間のmisrejoining) および15;17転座 (すなわちPML遺伝子とRAR α 遺伝子との間のmisrejoining) が起きる条件付き期待値 $E(AM-E|M)$, $E(P-R|M)$ は、

$$\begin{aligned}
 E(AM-E|M) &= \left(\frac{M N_{AML} N_{ETO}}{\Gamma^2} \right) \\
 &= 4.2 \times 10^{-10} M
 \end{aligned} \tag{16}$$

$$\begin{aligned}
 E(P-R|M) &= \left(\frac{M N_{PML} N_{RAR}}{\Gamma^2} \right) \\
 &= 2.6 \times 10^{-12} M
 \end{aligned} \tag{17}$$

で算定される。ただしAML遺伝子上の切断ターゲットサイズおよびETO遺伝子上の切断ターゲットサイズに関する知見は得られなかったので、ここでは遺伝子の全長で代用する。

すなわち、

NAML (AML遺伝子上の切断ターゲットサイズ) として、100[kb]
NETO (ETO遺伝子上の切断ターゲットサイズ) として87[kb]

NPML (PML遺伝子上の切断ターゲットサイズ) として4.4[kb]
 NRAR (RAR α 遺伝子上の切断ターゲットサイズ) として12[kb]
 を[8,10-12]、また、 Γ (ヒトのゲノムサイズ) として3,200[Mb]
 を用いることにする。

ところで、白血病の誘発に大きく関与する転座は、体細胞のうちでも分化能を持つ幹細胞に起きる転座である[19,20]。幹細胞は自己複製および分化した細胞を作り、細胞を補充する役目を持つ。1つの細胞あたりに生じる転座の期待数、すなわち転座の期待確率 $E(B-A|M)$ 、 $E(AM-E|M)$ 、 $E(P-R|M)$ に、 N_{stem} を乗じることにより、白血病に寄与する染色体異常のヒト1固体あたりの生起確率が算定される。すなわち

$$E(B-A|M)=8.5 \times 10^{-11} M \times N_{stem} \quad (18)$$

$$E(AM-E|M)=4.2 \times 10^{-10} M \times N_{stem} \quad (19)$$

$$E(P-R|M)=2.6 \times 10^{-12} M \times N_{stem} \quad (20)$$

ここに、

$P(B-A|M)$: Ph¹染色体の生起確率

$P(AM-E|M)$: t (8; 21)の生起確率

$P(P-R|M)$: t (15; 17)の生起確率

M: misrejoining[1/cell]

N_{stem} : 骨髄幹細胞数 [cells/person]

ところで、Radivoyevitchらによると、ヒトの骨髄幹細胞数 N_{stem} は $5 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$ 個と推定されている[20]ので、ここでは、 N_{stem} として、その中央値である 1.75×10^8 を用いる。

8.5 ベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座の誘発率

CML特異的染色体の転座、Ph¹染色体、AML-M2特異的転座 t (8;21)、AML-M3特異的転座 t (15;17)について、ベンゼン曝露による誘発率を(18),(19),(20)式より算定した。ベンゼンの曝露条件は、一般大気環境レベル(ケース 1)と職業曝露レベル(ケース 2)の2つのケースを設定した。ベンゼンの個人曝露量は、一般環境を対象に曝露評価を行った日高[13]の研究と、職業曝露による曝露評価を行ったSmith[21]の研究とを参考に決定した。すなわち、曝露条件を、

(ケース 1) 0[ppm]から 5×10^{-3} [ppm]までの各濃度で70年間曝露されるケース

(ケース 2) 0[ppm]から50[ppm]までの各濃度で1日あたり8時間、8ヶ月間曝露されるケース

とし、染色体転座の誘発率の増加を調べた。計算結果をFig. 8-6(A), (B)に示す。

まず、ベンゼンの曝露量が0[ppm]のときmisrejoiningは、細胞当たり 2.2×10^{-4} 個発生すると計算された。従って骨髓幹細胞におけるPh⁺染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、 3.3×10^{-6} [person⁻¹]、 1.6×10^{-5} [person⁻¹]、 1.0×10^{-7} [person⁻¹]と求められる。

一般大気環境から70年間、 5×10^{-3} [ppm]のベンゼンに曝露されると、Ph⁺染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、それぞれ 4.6×10^{-6} [person⁻¹]、 2.3×10^{-5} [person⁻¹]、 1.4×10^{-7} [person⁻¹]と、0 [ppm]における転座誘発率の約1.4倍に増加するとの推定結果を得た。

日高らによると、現在、一般大気中ベンゼンによる個人曝露濃度は、地域により差があるものの、約 $2 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-3}$ [ppm]である[13]。この濃度レベルで70年間曝露を受けたとき、骨髓中Ph⁺誘発率は $3.8 \sim 6.5 \times 10^{-6}$ [person⁻¹]と求められた。興味深いことに、この数値は、骨髓幹細胞におけるPh⁺染色体形成が病体を形成する本質であると考えられているCMLの我が国における年間発症率（100万人に5人程度、 5×10^{-6} ）[22]とほぼ一致している。

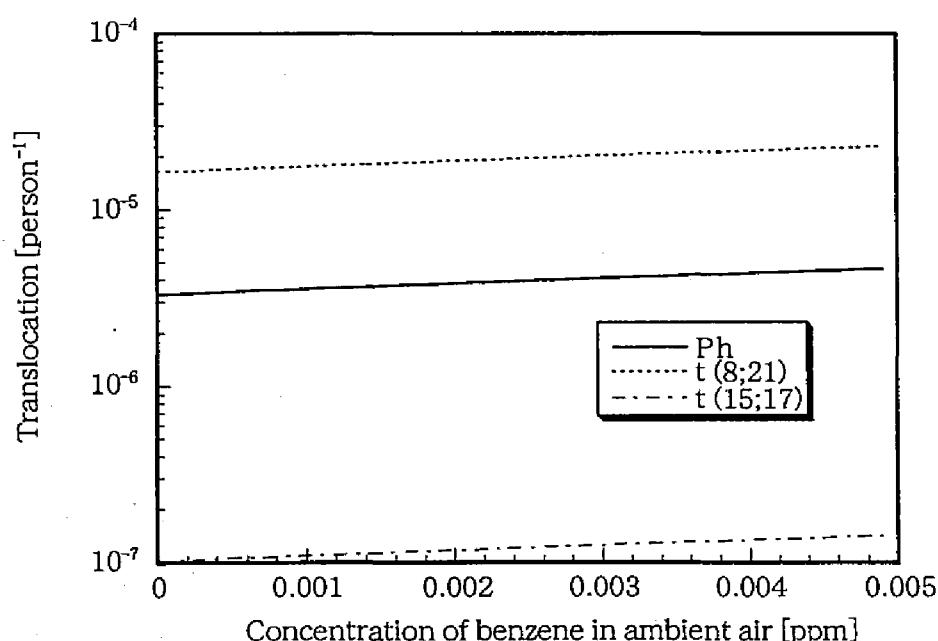


Fig. 8-6(A) 一般環境におけるベンゼン曝露による白血病特異的染色体転座の誘発率の評価例（ケース1）

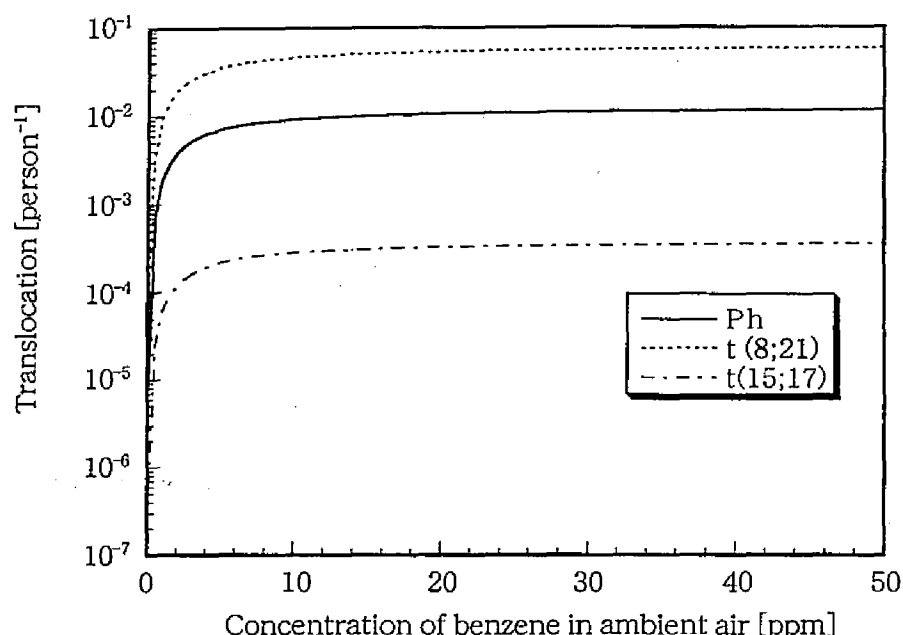


Fig. 8-6(B) ベンゼンの職業曝露による
白血病特異的染色体転座の誘発率の評価例 (ケース2)

職業的にベンゼンを曝露される場合では、染色体転座の誘発率曝露濃度が0[ppm]から急激に増加し、5[ppm]では約2,150倍に増加する。その後は、なだらかに増加を続けるが、曝露濃度が50[ppm]の場合、骨髓幹細胞におけるPh⁺染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、 1.2×10^{-2} [person⁻¹]、 5.7×10^{-3} [person⁻¹]、 3.6×10^{-4} [person⁻¹]と、0[ppm]の約3,500倍にまで増加した。一般大気環境から70年間、 5×10^{-3} [ppm]のベンゼンに曝露された時の転座誘発率と比較すると約2,500倍に増加している。

Smithらは、ベンゼンに曝露される労働者について、ベンゼンの曝露量とAML特異的染色体転座t(8;21)との関係を調べている[21]。職業的なベンゼン曝露のないコントロール群と、曝露濃度が31[ppm]以下の群、31[ppm]以上の群との間には濃度依存的にt(8;21)の頻度の増加が見られ、曝露濃度31[ppm]以上の群においてt(8;21) ポジティブ労働者数はコントロール群におけるt(8;21)ポジティブ数の約15倍と有意な差が観察されている。また1検体から平均483個のリンパ球細胞を採取して調べたt(8;21)の頻度は、コントロール群で約0.01%(1.0×10^{-4})、31[ppm]以上曝露群では約15倍の0.16%(1.6×10^{-3})となっている。

この計算結果と疫学調査との違いについては、2点の理由が考えられる。

1つは、本章では、ベンゼンの摂取により生成したHQのみが細胞およびDNAにダメージを与えると仮定したことに起因する。ベンゼンは、多種類の代謝物を生成する。確かに、HQのDNA損傷能は高い

が、HQの酸化によって生じるp-BQ（パラベンゾキノン）は、細胞毒性が非常に強いことが報告されている[16]。筆者の実験結果からも数倍～十数倍程度、p-BQの細胞毒性がHQの細胞毒性よりも強いと思われる（data not shown）。したがって、HQにより転座の誘発された細胞が、p-BQにより細胞死に至る可能性も高いと考えられる。

もう1つの理由として考えられるのは、ベンゼンの連続的な曝露による適応応答の可能性である。大腸菌では、一度低濃度のニトロソグアニジンに曝露したその後、この物質に対してDNA損傷修復酵素の誘導が速やかに、しかも大量に行われ、変異原性や毒性に耐性を示すようになる現象が広く知られている。こうした耐性の獲得を適応応答と呼ぶが、ほ乳類の培養細胞も放射線や抗がん剤マイトマイシンC、過酸化水素に対して適応応答を獲得することが確認されている[23,24]。ベンゼンの連続曝露により、生体内でも適応応答が起きている可能性も考えられる。

したがって、ベンゼン曝露により白血病関連染色体異常が誘発されるリスクを生物学的メカニズムに基づいて正確に評価するためには、マイナーな代謝生成物についても標的器官における濃度に関する情報や、長期曝露における適応応答に関する情報が必要であろう。

また本章で行った計算では、Ph¹染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、すべて等しく増加することになる。しかし職業的なベンゼンの曝露により発症率が有意に増加するのは、AMLであり、Ph¹染色体により誘発するCMLでは、発症率がわずかに増加はするものの、その有意性は確認できていない[25]。CMLの発症率とAMLの発症率に違いが生じる理由としては、CMLの誘発は、ほぼPh¹染色体の誘発のみに依存しているが、AMLの場合には染色体異常以外にも、がん遺伝子における点突然変異など、他のパスウェイが存在するためであると考えられる。実際、AMLの10～30%にN-ras遺伝子の点突然変異が観察されており、これらの症例のなかには染色体異常分析において「正常」と見なされているものもある[26-30]。第7章でも示したように、p-BQやMUC（ムコンアルデヒド）はHQと異なり、主に点突然変異を多く誘発するタイプの変異原物質である。ベンゼンの曝露によって、主にAMLが誘発されるのは、AMLの発症機構にいくつかのパスウェイが存在し、その異なるパスウェイに、それぞれ異なる代謝生成物が関与するためであろうと推察される。

8.6 まとめ

本章で得られた主要な結果を以下に要約する。

- (1) SMBEモデルを用いて、ベンゼン曝露による染色体転座の誘発率を推定した。一般大気環境から70年間、 5×10^{-3} [ppm]のベンゼンに曝露されると、Ph¹染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、それぞれ 4.6×10^{-6} [person⁻¹]、 2.3×10^{-5} [person⁻¹]、 1.4×10^{-7} [person⁻¹]と、0 [ppm]における転座誘発率の約1.4倍に増加するという計算結果を得た。
- (2) 骨髄幹細胞におけるPh¹染色体の形成は、慢性骨髄性白血病（CML）の病体を形成する本質であ

ると一般に考えられているが、一般大気環境中ベンゼン曝露によるPh¹染色体の誘発率とCMLの年間発症率（100万人に5人程度）は、ほぼ一致している。

- (3) 職業的にベンゼンに曝露される場合では、染色体転座の誘発率は曝露濃度が5 [ppm]まで急激に増加し、自然誘発率の約2,150倍に増加する。その後は、なだらかに増加を続けるが、曝露量が50 [ppm]の場合、骨髓幹細胞におけるPh¹染色体、t (8;21)、t (15;17)の誘発率は、 1.2×10^{-2} [person⁻¹], 5.7×10^{-2} [person⁻¹], 3.6×10^{-4} [person⁻¹]と、0 [ppm]の約3500倍まで増加するという推定結果を得た。職業曝露濃度が50 [ppm]における転座誘発率の推定結果は、一般大気環境から70年間、 5×10^{-3} [ppm]のベンゼンに継続曝露された時の転座誘発率の約2,500倍に増加する。
- (4)本章で採用した手順により推定した白血病に関連する染色体転座の誘発率は、疫学調査結果に較べると過大評価となった。ベンゼン曝露により白血病関連染色体異常が誘発されるリスクを評価するためには、細胞毒性の強いp-BQ（パラベンゾキノン）により転座を誘発された細胞が、細胞死に至り、生体内に生存しない可能性や、適応応答により転座の誘発が抑制される可能性等を考慮しなければならない。

参考文献

1. Joint Committee for Hematologic Neoplasms in Japan, *The report of hematologic Neoplasms Registration in Japan*, 5, 1981
2. Nowell, P. C. and Hungerford, D. A., *The etiology of leukemia: some comments on current studies*, *Semin Hematol*, 1966, 3(2), p. 114-21
3. 平井久丸編, 白血病の分子医学, 1994, 羊土社
4. Melo, J. V., *The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype*, *Blood*, 1996, 88(7), 2375-84
5. 佐藤裕子, [血液学ハイライト] 液疾患と染色体異常, 1993, 中外医学社
6. 桜井温雅, 白血病・悪性リンパ腫の染色体異常と臨床相関, *医学のあゆみ*, 1995, 175(13): p. 882-887
7. Miyoshi, H., et al, *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(23), p. 10431-4
8. Yaspo, M.L., et al., *Molecular analysis of 12 patients with the t(8;21) translocation and M2 acute myelogenous leukemia*, *Genes Chromosomes Cancer*, 1992, 5(2), p. 166-77.
9. Wolford, J.K. and M. Prochazka, *Structure and expression of the human MTG8/ETO gene*, *Gene*, 1998, 212(1), p. 103-9.
10. Tong, J.H., et al., *Molecular rearrangements of the MYL gene in acute promyelocytic leukemia (APL, M3) define a breakpoint cluster region as well as some molecular variants*, *Oncogene*, 1992, 7(2), p. 311-6.
11. de The, H., et al., *The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus*, *Nature*, 1990, 347(6293), p. 558-61.
12. Borrow, J., et al., *Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17*, *Science*, 1990, 249(4976), p. 1577-80.
13. Hidaka, H., *Risk-based Study on Lead, Benzene and MTBE-Health Risk Evaluations for Historical Change of Gasoline Constituents*, in *Global Environment Engineering*, 1998, Kyoto University, p.23-56.
14. Andreoli, C., et al., *DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis*, *Mutat Res*, 1999, 438(1), p. 37-45.
15. Olive, P.L. and P.J. Johnston, *DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization*, *Oncol Res*, 1997, 9(6-7), p. 287-94.
16. Colinas, R.J., et al, *In vitro effects of hydroquinone, benzoquinone, and doxorubicin on mouse and human bone marrow cells at physiological oxygen partial pressure*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 129(1), p. 95-102.

17. Radivoyevitch, T., *et al.*, *Misrejoining of double-strand breaks after X irradiation: relating moderate to very high doses by a Markov model*, Radiat Res, 1998, **149**(1), p. 59-67.
18. Radivoyevitch, T. and D.G. Hoel, *Modeling the low-LET dose-response of BCR-ABL formation: predicting stem cell numbers from A-bomb data*, Math Biosci, 1999, **162**(1-2), p. 85-101.
19. Boggs, D.R., *Editorial: Hematopoietic stem cell theory in relation to possible lymphoblastic conversion of chronic myeloid leukemia*, Blood, 1974, **44**(3), p. 449-53.
20. Trosko, J.E. and R.J. Ruch, *Cell-cell communication in carcinogenesis*, Front Biosci, 1998, **3**, p. 208-36.
21. Smith, M.T., *et al.*, *Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene*, Cancer Res, 1998, **58**(10), p. 2176-81.
22. 国立がんセンター, http://www.info.ncc.go.jp/NCC-CIS/pub/index/0sj/explan_pub.html
23. Zhou, P.K., *et al.*, *Adaptive response to mutagenesis and its molecular basis in a human T- cell leukemia line primed with a low dose of gamma-rays*, Radiat Environ Biophys, 1994, **33**(3), p. 211-7.
24. Oliveira, N.G., *et al.*, *Induction of an adaptive response to quercetin, mitomycin C and hydrogen peroxide by low doses of quercetin in V79 Chinese hamster cells*, Mutagenesis, 1997, **12**(6), p. 457-62.
25. Lamm, S.H., *et al.*, *Consistencies and inconsistencies underlying the quantitative assessment of leukemia risk from benzene exposure*, Environ Health Perspect, 1989, **82**, p. 289-97.
26. Bos, J.L., *et al.*, *Mutations in N-ras predominate in acute myeloid leukemia*, Blood, 1987, **69**(4), p. 1237-41.
27. Farr, C.J., *et al.*, *Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, **85**(5), p. 1629-33.
28. Bartram, C.R., *et al.*, *Acute myeloid leukemia: analysis of ras gene mutations and clonality defined by polymorphic X-linked loci*, Leukemia, 1989, **3**(4), p. 247-56.
29. Ahuja, H.G., *et al.*, *Analysis of proto-oncogenes in acute myeloid leukemia: loss of heterozygosity for the Ha-ras gene*, Blood, 1990, **75**(4), p. 819-22.
30. Ahuja, H.G., *et al.*, *The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing*, Blood, 1990, **75**(8), p. 1684-90.

第9章 結論

本研究は、ベンゼンを対象として、生物学的メカニズムを組み込んだ新しい発がんリスク評価体系の枠組みづくりを目標として進めてきた研究である。特に、ベンゼンの代謝生成物による突然変異の解析と、ベンゼンの代謝生成物による突然変異（染色体の転座）の誘発リスク評価に取り組んできた。以下に、各章における結論をまとめる。

まず第1章では、本研究の対象物質をベンゼンとその代謝生成物質に定めると共に、本研究の目的を設定した。

第2章

実験動物であるマウスとヒトとの種差について考察するために、マウス細胞における突然変異解析のツールとしてシャトルベクタープラスミドpNY200を構築した。結論として以下の知見を得た。

- (1) 本研究で新たに構築したシャトルベクタープラスミドpNY200は、様々な環境変異原の特性をマウス細胞を用いて検出することができ、この試験系は発がん試験のスクリーニング法として有効な手段となりうる。
- (2) すでに開発されているシャトルベクタープラスミドpMY189と組み合わせて用いることにより、細胞レベルではあるが、変異原のマウスとヒトとの間での特性の相違を把握することができる。すなわち、シャトルベクタープラスミドpNY200をpMY189と組合わせて使用する試験系は、細胞レベルであるが、突然変異に関する種差を特定する有効なパラメーターを提供するものと期待される。

第3章

シャトルベクタープラスミドpNY200を用いて、ベンゼン代謝物パラベンゾキノンの突然変異解析をマウス細胞について行った。結論として以下の知見を得た。

- (1) マウス細胞においてp-BQは強い変異原性を示すことを確認した。
- (2) 変異supF遺伝子の塩基配列により自然突然変異とは異なるp-BQ特有の突然変異の機構が存在することが示唆された。
- (3) さらにp-BQがsupF遺伝子のC、G塩基に与えた損傷によりA塩基への置換が生じたものと思われる。
- (4) 7.4mM p-BQによる総付加体量は、プラスミドあたり 8.5×10^{-3} であり、ポストラベル法では検出できないp-BQによるbulkyなアダクト以外の損傷（ex. 酸化的ダメージ、DNA鎖切断）の存在の可能性も考えられる。
- (5) 突然変異のホットスポットもしくはその付近で付加体が多く形成されていることからp-BQに

よる付加体の形成が突然変異に大きく起因していると考えられる。

第4章

第3章と同一試験系にてベンゼン代謝物パラベンゾキノンの突然変異解析をヒト細胞について行い、マウス細胞における突然変異解析結果と比較した。結論として以下の知見を得た。

- (1) 第3章でマウスHL18細胞において変異原性が確認された p -BQは、ヒトWI38-VA13細胞に対しても変異原性を示した。シャトルベクタープラスミドpMY189を9.3mMの p -BQに濃度で処理すると相対コロニー数はバックグラウンドの1.38%にまで減少し、突然変異頻度はバックグラウンド (7.8×10^{-4}) の約18倍の 1.4×10^{-3} に増加した。
- (2) 変異 $supF$ 遺伝子の塩基配列を調べた結果、 p -BQによる誘発突然変異には塩基対置換が多く見られ、その多くがG:C塩基対の置換であった。また、自然突然変異で多く見られた数10~100塩基以上の欠失および挿入は p -BQによる突然変異ではあまり見られなかった。
- (3) 自然突然変異と p -BQが誘発した突然変異のスペクトルとを比較したところ、ホットスポットが一致する位置もあったが、 p -BQが誘発した突然変異でのみホットスポットとなっている位置もあり、自然突然変異とは異なる p -BQ特有の突然変異機構の存在を示唆する結果を得た。
- (4) マウスHL18細胞とヒトWI38-VA13細胞との間では、相対コロニー数の p -BQ濃度依存的な減少のしかたや突然変異のホットスポット位置に大きな差は見られなかったが、突然変異頻度の増加率はヒトWI38-VA13細胞の方が小さいという結果を得た。また、マウスHL18細胞で p -BQが誘発した突然変異で多く見られたタンデム型塩基対置換がヒトWI38-VA13細胞ではあまり見られず、ヒトWI38-VA13細胞とマウスHL18細胞とでは p -BQによるDNA損傷の修復には何らかの差異があると考えられた。

第5章

第4章と同一試験系にてベンゼン代謝物ムコンアルデヒドの突然変異解析をヒト細胞について行った。結論として以下の知見を得た。

- (1) ヒトWI38-VA13細胞においてMUCが変異原性を示すことを確認した。シャトルベクタープラスミドpMY189を100mMのMUCで処理すると相対コロニー数はバックグラウンドの5.7%程度に減少し、突然変異頻度はバックグラウンド (MUC濃度0mM) の 2.0×10^{-4} から 5.2×10^{-3} と約25倍に増加している。
- (2) 自然突然変とMUCが誘発した突然変異の変異型を調べたところ、タンデム型の塩基置換の割合が自然突然変異では2.2%であるのに対し、MUCが誘発した突然変異では13.3%あり、有意な差があると確認された。
- (3) タンデム型塩基置換のうち41.7%がGGまたはCCサイトに誘発されていた。これは隣り合ったGG塩基間を架橋するためであると考えられる。

- (4)G:C塩基対における塩基置換が塩基置換全体の66.6%見られ、MUCはG:C塩基対に損傷を誘発する率が高いと考えられる。また自然突然変異とMUCが誘発した突然変異で、A:T塩基対がT:A塩基対に置換するTransversion型の変異の誘発率に有意な差が確認された（自然：0%、MUC誘発：14.8%）。これらの結果は、MUCが遊離ヌクレオシドであるデオキシグアノシン、デオキシシアデノシンと付加体を形成するという報告と一致する。
- (5)MUCによる突然変異スペクトルは、クロロアセトアルデヒド、アセトアルデヒド、クロトンアルデヒド、アクロレインによる突然変異スペクトルと類似しており、アルデヒド化合物に特異的なメカニズムで突然変異が誘発すると考えることができる。

第6章

第4章と同一試験系にてベンゼン代謝物ハイドロキノンの突然変異の解析をヒト細胞について行った。結論として以下の知見を得た。

- (1)HQはNADHおよびCu(II)存在下で、DNA鎖を切断し、さらにヒトWI38-VA13細胞において変異原性を示すことを確認した。シャトルベクタープラスミドpMY189をNADHおよびCu(II)共存下でHQ（100mM）で処理すると、相対コロニー数はバックグラウンドの18.3%程度に減少し、突然変異頻度はバックグラウンド（HQ濃度0 μ M）の 2.1×10^{-4} から 4.9×10^{-3} と約23倍に増加した。
- (2)HQ酸化還元処理突然変異のうち最も多い変異のタイプは欠失で、自然突然変異では全体の19.6%しかないのに対し、HQの酸化還元による突然変異では全体の42.4%を占めており、有意な差を確認した。またsupF遺伝子から欠失したDNAは41b以上のものが全体の75%を占めていた。また、その50%がslippagemisparingによると考えられる欠失であった。
- (3)HQ酸化還元処理突然変異と自然突然変異とでは、塩基対置換のタイプが極めてよく似ていた。HQ酸化還元処理突然変異および自然突然変異ともにそれぞれG:C塩基対からA:T塩基対へのtransition型の置換（同性塩基対置換）が最も多く、全体の39.5%、33.9%を、次いでG:C塩基対からT:A塩基対へのTransversion型塩の置換がそれぞれ34.6%、27.4%を占めていた。またHQ酸化還元処理誘発および自然誘発、両変異ともにA:T塩基対における塩基置換が少なく、それぞれ全体の2.5%、12.9%であった。またH₂O₂誘発突然変異の塩基対置換のタイプともよく似ており、自然突然変異およびHQ酸化還元処理誘発突然変異の塩基置換はH₂O₂により誘発される塩基置換と同じ機構で誘発されていると考えられる。
- (4)自然突然変異およびHQ酸化還元処理誘発突然変異のスペクトルを調べたところ、自然突然変異とHQ酸化還元処理誘発突然変異とで比較的類似していた。両者の突然変異ホットスポットは、123残基目であった。

第7章

第4,5,6章の結果を比較することで、ベンゼンによる白血病誘発のイニシエーターとして最も

強く作用する代謝生成物質の検討を行った。結論として以下の知見を得た。

- (1) 突然変異ポテンシャルが最も高いのは酸化剤、還元剤存在下におけるHQであり、そのポテンシャルは、*p*-BQの約15倍、MUCの約600倍である。
- (2) HQでは欠失が最も多く特徴的な変異型である。欠失したDNAサイズも大きく、41b以上の欠失が全体の75%を占めている（Table6-2 参照）。
- (3) ベンゼンによる突然変異型で特徴的なのはDeletion（欠失）が、多く見られることである。欠失は全体の約20%を占めている。ちなみに現時点で公開されているDatabase上では、数%以上の欠失が見られる物質は、DMN（ジメチルニトロソアミン）と γ 線のみである。このことから、マウスがベンゼンを摂取したとき、マウスの生体内では欠失を誘発するような物質が生成し、その物質による突然変異が顕著に表れていると考えられる。
- (4) ベンゼン代謝生成物による突然変異には、HQが最も大きく寄与すると考えられる。

第8章

ベンゼンに曝露されることで、ベンゼン代謝物が誘発する白血病のイニシエーションの定量化を試みた。結論として以下の知見を得た。

- (1) SMBEモデルを用いて、ベンゼン曝露による染色体転座の誘発率を推定した。一般大気環境から70年間、 5×10^{-3} [ppm]のベンゼンに曝露される仮定すると、Ph¹染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、それぞれ 4.6×10^{-6} [person⁻¹]、 2.3×10^{-5} [person⁻¹]、 1.4×10^{-7} [person⁻¹]と、0 [ppm]における転座誘発率の約1.4倍に増加するという計算結果を得た。
- (2) 骨髓幹細胞におけるPh¹染色体の形成は、慢性骨髄性白血病（CML）の病体を形成する本質であると考えられているが、一般大気環境中ベンゼン曝露によるPh¹染色体の誘発率とCMLの年間発症率（100万人に5人程度）は、ほぼ一致している。
- (3) 職業的にベンゼンに曝露される場合、染色体転座の誘発率は曝露濃度が5 [ppm]まで急激に増加し、自然誘発率の約2,150倍に増加する。その後は、なだらかに増加を続けるが、曝露濃度が50 [ppm]の場合、骨髓幹細胞におけるPh¹染色体、t(8;21)、t(15;17)の誘発率は、 1.2×10^{-2} [person⁻¹]、 5.7×10^{-2} [person⁻¹]、 3.6×10^{-4} [person⁻¹]と、0[ppm]の約3,500倍まで増加するという推定結果を得た。職業曝露濃度が50 [ppm]における転座誘発率の推定結果は、一般大気環境から70年間、 5×10^{-3} [ppm]のベンゼンに継続曝露された時の転座誘発率の約2,500倍に増加する。
- (4) 本章で採用した手順により推定した白血病に関連する染色体転座の誘発率は、疫学調査結果に較べると過大評価となった。ベンゼン曝露により白血病関連染色体異常が誘発されるリスクを評価するためには、細胞毒性の強い*p*-BQ（パラベンゾキノン）により転座を誘発された細胞が、細胞死に至り、生体内に生存しない可能性や、適応応答により転座の誘発が抑制され

る可能性等を考慮しなければならない。

本研究の最終的な目標は、新しい健康リスク評価のための技術体系の枠組みを作ることである。これまで放射線については発がんのあらゆる段階において多岐に渡る研究がなされ、その成果はさまざまな放射線リスク評価手法に利用されている。放射線による影響評価手法を、化学物質にも適用できれば、新しい健康リスク評価体系を構築できるのではないだろうか。

本研究では、試験管内で行う分子生物学および細胞生物学的実験データから、ヒトに白血病が誘発される確率を推定することを試みた。しかしながら、第8章の結論にも述べた通り、白血病に関連する染色体転座の誘発率は、疫学調査結果に較べると過大評価となった。この原因は、ベンゼン代謝生成物の複合的な影響や、連続曝露により生体が獲得する耐性の問題などを考慮しなかったことにあると考えられる。この点は、これまでの放射線による影響評価手法でも考慮されてこなかった問題である。

今後、ベンゼンがヒトに白血病を誘発するリスクを正確に評価するモデルを提示するためには、以下の課題について検討せねばならない。

すなわち、

- (1) ベンゼン代謝生成物による複合影響
- (2) 連続曝露による耐性の獲得

である。この2点に関する生物学的情報を組み込むことにより、より詳細で正確な生物学のメカニズムに基づいた健康リスク評価体系を構築することが出来れば、疫学調査データのない物質に対しても、予防的に適用することが可能になると期待できる。

謝辞

京都大学工学研究科森澤眞輔教授には、本研究の遂行から本論文の執筆まで終始丁寧にご指導いただき、心から感謝しております。本論文を審査下さった京都大学工学研究科寺島泰教授ならびに松井三郎教授に深くお礼申し上げます。また、京都大学工学研究科米田稔助教授には、適時有益な示唆をいただきました。

本研究の成果の多くは、京都大学医学研究科放射線遺伝学教室にて、ご指導頂いた結果得られたものです。京都大学医学研究科名誉教授武部啓先生（現近畿大学教授）をはじめ、八木孝司先生（現大阪府立大学教授）、宮越順二先生（京都大学医学研究科助教授）、巽順子先生（京都大学医学研究科助手）には深く感謝いたします。特に八木孝司先生と環境微量汚染制御センターの川西優喜さん（現大阪府立大学助手）には、実験の方法、結果の考察、その他生物学の楽しさまで、本当に数多くのことを教えて頂きました。また、宮越順二先生には、武部先生退官後も快く実験させていただき、深く感謝しています。

実験室を放射線遺伝学教室から工学部RI研究実験棟に移してからは工学研究科環境工学の越川先生、大河内さん、環境微量汚染制御センターの松田先生や学生さんに助けて頂くことも少なくありませんでした。本当にたくさんの方々のご指導を頂くことができました。皆様に、心から感謝いたします。

工学的な視点から環境汚染物質の生物影響を調べたい、というのが私がこの研究を始めた動機でした。その頃、武部啓先生とお会いできたことは、本当に幸運だったと思います。どんなことにも興味を持たれる武部先生のもとで、わたしは研究を楽しむということを教わりました。八木先生から「素晴らしい」という言葉を頂くたびに、一層研究の楽しさを感じました。武部先生の退官後、宮越順二先生のラボに、楽しく活気あふれた武部研の空気が引き継がれたことは、私にとっても、とてもうれしいことでした。

武部研では、多くの素晴らしい出会いに恵まれました。留学生の陸さん、秘書の中嶋（北条）さん、理学部の佐々木くん、環境微量汚染制御センターの森くん、人間環境学研究科の福田さん、矢口さん、実験助手の吉田さん、京都女子大学の石坂さん、関西電力の小路さん、東京電力の若狭さん、その他医学部の学生さんたち。個性的かつバワフルな人ばかりの中で、私は多くの影響を受け、かけがえのない素晴らしい時間を過ごすことが出来ました。

武部先生の退官後、放射線遺伝学教室教授に着任なさった武田俊一先生にも、とても多くの事を教えていただきました。武田先生のセミナーは分かりやすく、とても勉強になりました。武田先生のお陰で、放射線取扱主任者第1種試験にも合格できました。先生方と同じ試験問題で頭を悩ませたことは、本当に楽しい経験でした。武田先生の秘書でいらした平尾さん、古賀さんにも、本当にお世話になりました。

私が、これほど自由で楽しい学生生活を送れたのは、ホームグラウンド「森澤研」があったからこそです。井上頼輝先生（現福井工業大学教授）、森澤眞輔先生、米田稔先生、堀内将人先生（現大同工業大学助教授）には、心から感謝しています。先生方が作り出す研究室の暖かい雰囲気は、他の研究室では得られないものだと思います。森澤研では、先生方ばかりでなく、先輩、同級生、後輩にも恵まれました。特に実験を共に行った小吉省吾くん、野口芳弘くんの助力がなければ、この研究は遂行できなかったでしょう。森澤研でお会いした全ての方に、本当に心から感謝します。森澤研のみなさんのお陰で、こんなに楽しい学生生活を送ることができました。

最後にもう一度、私のボスである森澤眞輔教授に深く感謝の気持ちを表したいと思います。研究に対する自信などなかった私が、それでも博士課程に進学したのは、森澤先生のもとで研究できることはきっと幸せだろうと感じたからです。博士課程進学以来、研究について、将来について、不安を感じることは少なくありませんでしたが、その度に森澤先生にはあたたかい励ましと助言を頂きました。森澤先生のもとで研究できたことは、本当に幸せだったと思います。心から感謝しています。ありがとうございました。

わたしの長かった学生生活は、研究を通して常に出会いに恵まれてきました。これまでに会うことのできた先生方や友人と共に、笑ったり悩んだりできたことは素晴らしい経験であったと思います。ほんとうにありがとうございました。そして、これからもよろしくお願いします。

発表論文リスト

1. 米田稔, 三井昌文, 中山亜紀, 森澤眞輔, 生活環境大気中におけるDBP, DEHP 濃度とフガシティモデルによるその推定, 環境工学研究論文集, 第35巻, pp.205-216, 1998
2. Masanobu Kawanishi, Tomonari Matsuda, Aki Nakayama, Hiraku Takebe, Saburo Matsui and Takashi Yagi, . Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids, *Mutation Research* , vol.417, 2-3, pp.65-73, 1998
3. Aki Nakayama, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Shinsuke Morisawa and Hiraku Takebe, Molecular Analysis of Mutation Induced by a Benzene Metabolite p-Benzoquinone in Mouse Cells Using Novel Shuttle Vector Plasmid, *Mutation Research* , vol.444, 1, pp.123-131, 1999
4. 中山亜紀, 小吉省吾, 八木孝司, 森澤眞輔, ベンゼン代謝生成物による突然変異とその種差 —生物学的メカニズムに基づいた発がんリスク評価を目指して—, 日本リスク研究学会講演論文集第12巻, pp.87-91, 1999
5. 森澤眞輔, 日高大彰, 中山亜紀, 米田 稔, ガソリン添加物質の変遷と日本人の健康リスク, 日本リスク研究学会講演論文集第12巻, pp.92-97, 1999
6. Aki Nakayama, Shougo Koyoshi, Shinsuke Morisawa and Takashi Yagi, Comparison of the mutations induced by p-benzoquinone, a benzene metabolite, in human and mouse cells, *Mutation Research* , vol.470, 2, pp.147-153, 2000
7. Aki Nakayama, Shinsuke Morisawa and Takashi Yagi, Molecular analysis of mutations induced by trans, trans-muconaldehyde in supF shuttle vectors propagated in human cells (submitted to *Mutagenesis*)